

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir
le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

par Gauri Shankar MISHRA

1^{re} Thèse :

Contribution à l'étude d'*Angiostrongylus cantonensis*
(Chen, 1935)
(Biologie, pathologie, immunologie)

2^e Thèse :

Résultats des analyses électrophorétiques effectuées
sur les animaux infestés expérimentalement par
A. cantonensis et *A. vasorum*

Soutenues le 5-12 1970 devant la Commission d'Examen

M. LAMOTTE, Président

M. GUILHON, Rapporteur

M. DREUX Examineur

M^{lle} BENEX Examineur invité

THESES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

par Gouri Shankar MISHRA

1^{re} Thèse

Contribution à l'étude d'*Angiostrongylus cantonensis*
(Chen, 1935)

(Biologie, pathologie, immunologie)

2^e Thèse

Résultats des analyses électrophorétiques effectués
sur les animaux infestés expérimentalement par
A. cantonensis et *A. vasorum*

Soutenues le

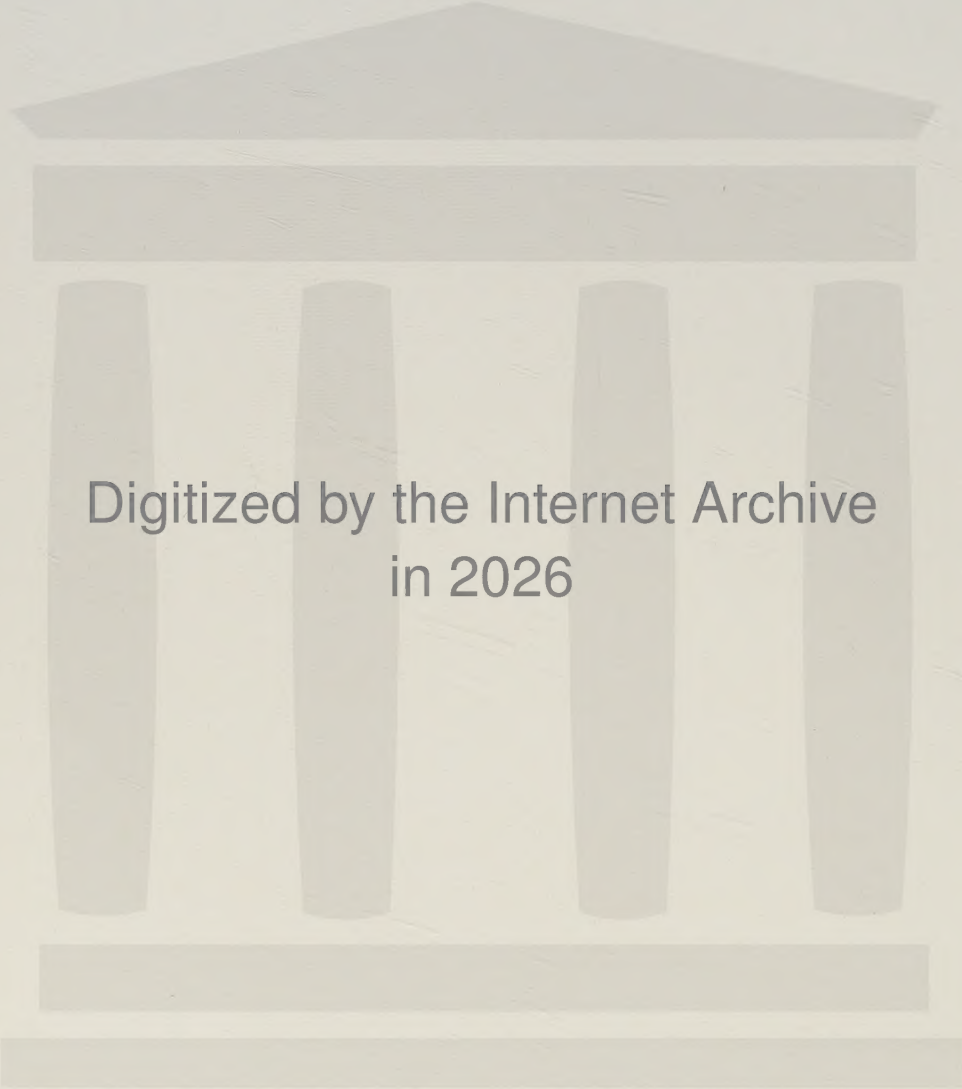
devant la Commission d'Examen

M. LAMOTTE, Président

M. COLUCCI, Rapporteur

M. DEBIE, Examinateur

M^{lle} RENÉ, Examinateur Invité



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551504_0032

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

par **Gauri Shankar MISHRA**

1^{re} Thèse :

Contribution à l'étude d'*Angiostrongylus cantonensis*
(Chen, 1935)
(Biologie, pathologie, immunologie)

2^e Thèse :

Résultats des analyses électrophorétiques effectuées
sur les animaux infestés expérimentalement par
A. cantonensis et *A. vasorum*

Soutenues le

devant la Commission d'Examen

M. LAMOTTE, Président

M. GUILHON, Rapporteur

M. DREUX Examineur

M^{lle} BENEX Examineur invité

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

par Gouri Shankar MISHRA

1^{re} Thèse :

Contribution à l'étude d'*Angiostrongylus cantonensis*
(Chen, 1932)
(biologie, pathologie, immunologie)

2^e Thèse :

Résultats des analyses électrophorétiques effectuées
sur les animaux infectés expérimentalement par
A. cantonensis et *A. vasorum*

Devant le Comité de l'Université d'Orléans



Acquis par la

M. LACROIX, Président
M. KULLON, Rapporteur
M. DEBIE, Examinateur
M. KUIJER, Examinateur invité

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

(Mention : Sciences)

par

Gauri Shankar M I S H R A

1ère Thèse : CONTRIBUTION A L'ETUDE D'ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS
(CHEN, 1935)

(BIOLOGIE, PATHOLOGIE, IMMUNOLOGIE)

2ème Thèse : RESULTATS DES ANALYSES ELECTROPHORETIQUES EFFECTUEES SUR LES
ANIMAUX INFESTES EXPERIMENTALEMENT PAR A. CANTONENSIS
ET A. VASORUM

Soutenues le

devant la Commission d'Examen

M. LAMOTTE	Président
M. GUILHON	Rapporteur
M. DREUX	Examineur
Melle BENEX	Examineur invité

Notre travail est présenté dans deux thèses.

La première est consacrée à l'étude de la biologie et du rôle pathogène d'Angiostrongylus cantonensis et aux réactions immunologiques des rats infestés expérimentalement par ce Nématode.

La deuxième renferme tous les résultats del'étude biochimique entreprise sur les Rongeurs (rat, lapin) et Carnivores (chien, chat) infestés expérimentalement par Angiostrongylus cantonensis et Angiostrongylus vasorum.

Gauri Shankar M I S H R A

CONTRIBUTION A L'ETUDE D'ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS (CHEN, 1935)
(BIOLOGIE, PATHOLOGIE, IMMUNOLOGIE)

1ère partie - Etude biologique et rôle pathogène
d'Angiostrongylus cantonensis

2ème partie - Etude immunologique

Le travail que nous présentons pour l'obtention du Doctorat d'Université (Sciences Naturelles) a pu être entrepris et terminé grâce à une subvention allouée sous la forme d'une bourse de Parasitologie.

L'auteur rend hommage au Gouvernement Français pour l'honneur qui lui a été accordé et pour les facilités consenties.

MISHRA, G.S.

A Monsieur le Professeur M. LAMOTTE
de la Faculté des Sciences de l'Université de Paris

qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de notre
jury d'examen

Hommage très respectueux

A Monsieur le Professeur J. GUILHON
Directeur du Laboratoire de Parasitologie
de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (Paris)

qui nous a inspiré ce travail

Hommage très reconnaissant

A Monsieur le Professeur Ph. DREUX
de la Faculté des Sciences de l'Université de Paris

qui a bien voulu accepter de faire
partie de notre jury.

Hommage respectueux

A Mademoiselle J. BENEX
Chef du Laboratoire d'Immunologie parasitaire
à l'Institut Pasteur de Paris

qui nous a guidé dans une partie de
notre travail.

Sentiments de vive gratitude

A Monsieur le Professeur L. LAMY

Chef du Service de Protozoologie-Parasitologie

de l'Institut Pasteur de Paris

qui a bien voulu nous accepter
dans son Service.

Avec nos sincères remerciements

A Monsieur le Docteur J.P. PETIT

Chef du Laboratoire de Biochimie

de l'Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays
Tropicaux

qui nous a guidé dans une partie
de notre travail.

Avec nos vifs remerciements.

Nous adressons nos sincères remerciements à :

Monsieur le Professeur G. JOLIVET

Monsieur le Professeur Ch. PILET

Monsieur le Docteur A. MARCHAND, Maître-Assistant

de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
pour leurs excellents et précieux conseils.

Mademoiselle R. BARNABE qui a eu sa large part dans l'achèvement
de ce travail.

Toute notre sympathie au personnel des Laboratoires de Parasitologie
et de Microbiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
d'Immuno-Parasitologie de l'Institut Pasteur de Paris et du Labo-
ratoire de Biochimie de l'Institut d'Elevage et de Médecine Vétéri-
naire des Pays Tropicaux et plus particulièrement à Mesdames
CENS, MARCHAND, ROUGE, CADORET, Mesdemoiselles LE GARREC, SIMIER, D. T.
BARBRON, BILLARD, et Messieurs SHUKLA, L. PETIT, SABOLOVIC,
J.P. VIAULT et KRISHNAMOORTHY.

Nos remerciements vont également à Monsieur MORAWEIKEY, à Mademoiselle MENU et à tout le personnel du C.R.O.U.S. de Paris, ainsi qu'à Monsieur l'Ambassadeur CHATTERJI, Messieurs PUSPA DAS et G.P. SINGH, Mademoiselle V.R. SOANS et au personnel de l'Ambassade de l'Inde à Paris qui ont facilité mon séjour en France.

Enfin, très sincèrement, nous assurons de notre reconnaissance notre famille pour la grande patience qu'elle a montrée, et sa compréhension, durant notre longue absence de notre Pays.

Paris, octobre 1970

PREMIERE PARTIE

I N T R O D U C T I O N

Durant ces dernières années, le Nématode parasite de l'appareil circulatoire du Rat, Angiostrongylus cantonensis (CHEN, 1935) a attiré l'attention de nombreux auteurs, car ce Métastrongylidé s'est révélé être l'agent causal de la méningite à éosinophiles de l'Homme dans les Iles du Pacifique et du Sud-Est asiatique.

Ce grand intérêt général nous a conduit à étudier sa biologie, son rôle pathogène et les réactions immunologiques de son hôte spécifique, le Rat.

Pour nos travaux nous avons utilisé la souche de ce Métastrongle entretenue au Laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (France). Ce parasite n'ayant pas été, jusqu'à maintenant, signalé en Europe, la souche a été envoyée d'Honolulu au Professeur GUILHON par le Docteur ROSEN. L'évolution et le cycle complet sont réalisés grâce à des rats blancs et à des mollusques des régions tropicales, comme hôtes intermédiaires (Biomphalaria glabrata).

Depuis notre arrivée au Laboratoire, sous la direction de M. le Professeur GUILHON, nous avons essayé de compléter l'étude du cycle de ce parasite et son évolution chez le rat. Parallèlement nous avons étudié les possibilités d'infestation chez d'autres Rongeurs (cobaye, souris, lapin) et chez des Carnivores : le chien et le chat.

HISTORIQUE

Le Nématode de la famille des Métastrongylidés que nous avons étudié a été découvert par CHEN dans le coeur droit et l'artère pulmonaire du Rat (Rattus norvegicus, Rattus rattus), en 1935, à Canton (Chine) auquel il a donné le nom de Pulmonema cantonensis. YOKOGAWA, en 1937, signale l'existence d'un parasite des rats qu'il nomme Haemostrongylus ratti, espèce nouvelle, et MATSUMOTO, la même année, le trouve dans les artères pulmonaires de rats sauvages. DOUGHERTY, en 1949, étudie la phylogénie des représentants de la famille des Métastrongylidés, LEIPER 1909, et l'introduit dans le genre Angiostrongylus (KAMENSKY, 1905).

Après cette époque MACKERRAS et SANDARS le trouvent, en 1954, à Brisbane (Australie) chez 5% des rats (Rattus norvegicus). Ces mêmes auteurs, en 1955, étudient son cycle évolutif complet, qui comporte obligatoirement un hôte intermédiaire, Gastéropode limacidé - Limax arborum BOUCHARD-CHANTEREAUX et plus spécialement Agriolimax laevis (MULLER)-, et un séjour prolongé (28 jours environ) dans le cerveau du rat avant d'atteindre son habitat définitif : l'appareil circulatoire (coeur droit et artère pulmonaire).

Angiostrongylus cantonensis peut aussi se développer dans le cerveau d'hôtes occasionnels, particulièrement chez l'Homme, provoquant une méningite à éosinophiles. C'est NOMURA et LIM, en 1945, qui découvrirent pour la première fois Haemostrongylus ratti (= A. cantonensis) dans le liquide céphalo-rachidien d'un enfant de 15 ans, à Formose, et BAILEY, en 1948, rapporte ensuite une endémie de méningite à éosinophiles dans les Iles du Pacifique, notamment à Ponape et aux Iles Carolines de l'Ouest. L'étude clinique de l'affection a été faite par plusieurs chercheurs :

TRUBERT (1952), en Nouvelle-Calédonie, FRANCO et coll. (1960) à Tahiti et en Nouvelle-Calédonie, ROSEN et coll. (1961) à Tahiti et en Polynésie française, HORIO et coll. (1961) à Hawaii, PROMMINDAROJ et coll. (1962) à Bangkok, PUNYAGUPTA (1965) en Thaïlande, qui pensèrent que l'infestation chez l'Homme se produisait par l'ingestion de Gastéropodes consommés crus.

Certes on avait déjà signalé un peu partout, et plus particulièrement en Europe, des éosinophilies rachidiennes au cours d'atteintes neuro-méningées, fort rares, dues à des Cestodes (Cysticerques), des Nématodes (Ascaris) ou des Trématodes (Distomes, Schistosomes). Des éosinophilies rachidiennes, d'étiologie indéterminée, avaient été reconnues dans les deux Amériques, en Europe, aux Philippines, au Japon, en Indonésie. Dans le Pacifique on est loin de ces quelques cas isolés, puisque en 1960, FRANCO et coll., et en 1961 ROSEN et coll. rapportaient près de 300 observations. A Nouméa, l'Institut Pasteur enregistre en moyenne une quarantaine de cas par an, pour une population de 70.000 habitants que compte la Nouvelle-Calédonie. A Nouméa le syndrome est décrit pour la première fois sous sa forme épidémique (40 cas), en 1951, par TRUBERT et FRANCO. Il est signalé à Tahiti à partir de 1957. Des hypothèses étio-pathogéniques étaient proposées en 1961, par ROSEN, LAIGRET et BORIES qui, à Tahiti (70.000 habitants) présentaient une statistique imposante de 200 cas.

La responsabilité d'Angiostrongylus cantonensis dans cette affection de l'Homme a été établie dans les Territoires du Pacifique Sud (Hawaii, Tahiti, Nouvelle-Calédonie, Iles Cook, Nouvelle-Zélande, Samoa de l'Ouest et Micronésie) par ALICATA (1961, 1962, 1963 et 1965), et par ALICATA et coll. (1964 et 1965).

JINDRAK et coll. (1965) rapportent un cas clinique de méningite à éosinophiles chez une jeune fille de 18 ans à Haiphong (Vietnam) qui était traitée pour une méningite tuberculeuse. Mais elle décéda le sixième jour à l'hôpital de l'Amitié Tchécoslovaque-vietnamienne.

LOISON et coll. (1962), WEINSTEIN et coll. (1963) et ALICATA (1963) ont réussi à reproduire la méningite à éosinophiles en infestant des Primates : Macacus rhesus.

REPARTITION GEOGRAPHIQUE

La connaissance de la répartition géographique d'Angiostrongylus cantonensis reste encore incomplète. Son aire de dispersion s'étend dans les zones tropicales, du 23ème degré de latitude Nord (Tropique du Capricorne) au 23ème degré de latitude Sud (Tropique du Cancer), régions à climat chaud et humide, possédant une végétation intense. Ces trois facteurs réunis sont favorables à la propagation des Rongeurs et des Mollusques et par voie de conséquence, favorisent le développement et la dissémination de l'Angiostrongylose murine.

Il semble que les climats froids ou très froids ne sont pas favorables à l'évolution du parasite. C'est pourquoi, sans doute, ce Nématode n'a pas encore été signalé en Amérique, dans le Continent européen, en Afrique et en Nouvelle-Zélande.

Dans le tableau I nous rapportons avec plus de détails, la distribution géographique de ce Nématode, ainsi que les cas de méningite à éosinophiles de l'Homme, en rapport avec l'affection murine, signalés dans la littérature jusqu'en mars 1969.

Tableau 1

Localités	Cas signalés	
	d'angiostrongylose murine	de méningite à éosinophiles de l'Homme
Australie	MACKERRAS et SANDARS 1954-1955	-
Bornéo (Sarawak)	ALICATA 1966	-
Iles Carolines (Babelthuap Koror (Palau)	WALLACE et ROSEN 1965	-
Pingelap	JACKSON 1962	-
Moen		
Ponape	JACKSON 1962	BAILEY 1948
Ceylan	ALICATA 1966	-
Chine (Canton)	CHEN 1935	-
Iles Cook Rarotonga	ALICATA et Mc CARTHY 1964	ALICATA et Mc CARTHY 1964
Iles Hawaii Hawaii	WALLACE et ROSEN 1965	ROSEN et coll. 1962
Kauai		
Maui		
Oahu	ASH 1962	ROSEN et coll. 1962
Inde	PARMETER et CHOWDHURY 1966	-
Japon	ORBAYASHI et ORIHARA 1968	-
Iles de Ryukyu		
Ishigaki-jima	NISHIMURA 1966	-
Miyako-jima-		
Okinawa	ALICATA et NISHIMURA 1965	-
Iles de la Loyauté		
Lifou	ALICATA 1963	-
Maré	-	ROSEN et coll. 1967
Madagascar	BRYGOO et CHABOUD 1964	-
Malaisie	SCHACHER et CHEONG 1960	-

Iles Mariannes	LINDQUIST et LI 1955	ALICATA 1965
Guam	ALICATA 1965	ALLISON 1962
Saipan	ALICATA 1965	-
Rota, Tinian		-
Ile Maurice	ALICATA 1966	-
Nouvelle-Calédonie	ALICATA 1963	TRUBERT 1952
Iles des Pins	-	ROSEN et coll. 1967
Nouvelles-Hébrides		
Ile du Saint-Esprit	ALICATA 1963	ALICATA 1963
Iles Philippines		
Luçon	NISHIMURA et YOGORE 1965	SISON et coll. 1951
Iles de la Société		
Bora bora		
Hauhine	WALLACE et ROSEN 1965	-
Moorea		
Raiatea		
Tahaa	WALLACE et ROSEN 1965	ROSEN et coll. 1967
Tahiti	ALICATA 1962	FRANCO et coll. 1960
Iles Salomon		
Guadalcanal	WALLACE et ROSEN 1965	-
Sumatra	KWO 1967	SMIT 1962
Fomose		
Taiwan	YOKOGAWA 1937	NOMURA et LIN 1945
		HUANG et coll. 1969
Lan-ya, Peng-hu	KUNTZ et MYERS 1964	-
Thaïlande	HARINASUTA et coll. 1965	PUNYAGUPTA 1965, KETSUWAN et coll. 1965, PROMMINDARAJ et coll. 1962
Vietnam	-	JINDRAK et ALICATA 1965

HÔTES DEFINITIFS, HÔTES INTERMÉDIAIRES,
HÔTES PARATENIQUES et HÔTES ACCIDENTELS

Depuis 1935 de nombreux auteurs ont entrepris l'étude de la réceptivité de ce parasite. Ils ont obtenu le cycle expérimental en utilisant différents Mollusques comme hôtes intermédiaires et de nombreux Vertébrés comme hôtes définitifs et paraténiques.

Nous donnons les résultats obtenus par ces auteurs sous forme de deux tableaux successifs (II et III).

Tableau II

HÔTES DEFINITIFS

Espèces	Familles	Auteurs	Pays
<u>Bandicota indica</u> <u>memorivaga</u>	Rongeurs, Muridés Murinés	KUNTZ et coll. 1964	Taiwan (Formose)
		CROSS 1967	Taiwan
		BRUMPT et coll. 1968	Cambodge
<u>Bandicota indica</u>	"	CROOK et coll. 1968	Thaïlande
<u>Canis familiaris</u>	Canidés	GUILHON 1965	France
<u>Herpestes urva</u>	Fissipèdes, Viverridés Herpestinés	WOOD 1965	Taiwan
<u>Rattus argentiven-</u> <u>ter</u>	Rongeurs, Muridés	LIM et coll. 1965	Kuala Lumpur
<u>Rattus annandalei</u>	"	"	"
<u>Rattus bowersi</u>	"	"	"

<u>Rattus cremori- venter</u>	Rongeurs, Muridés Murinés	LIM 1967	Malaisie Sarawak
<u>Rattus coxinga coxinga</u>	"	CROSS 1967 KUNTZ et coll. 1964	Taiwan Taiwan
<u>Rattus diardi</u>	"	LIM et coll. 1965	Kuala Lumpur
<u>Rattus exulans</u>	"	ROSEN 1967 LIM 1967 LIM et coll. 1963 ALICATA 1963	Noumea Malaisie Sarawak Kuala Lumpur Nouvelle-Calédonie
<u>Rattus jalorensis</u>	"	LIM et coll. 1965 LIM 1967	Kuala Lumpur Malaisie Sarawak
<u>Rattus losea</u>	"	CROSS 1967 KUNTZ et coll. 1964	Taiwan Taiwan
<u>Rattus muelleri</u>	"	LIM et coll. 1965	Kuala Lumpur
<u>Rattus norvegicus</u>	"	BRUMPT et coll. 1968 ROSEN 1967 CROSS 1967 LIM et coll. 1965 NISHIMURA et coll. 1965 ALICATA 1963 MACKERRAS et coll. 1954	Cambodge Noumea Taiwan Kuala Lumpur Japon Nouvelle-Calédonie Australie
<u>Rattus rattus</u>	"	MACKERRAS et coll. 1954 KUNTZ et coll. 1964 CROSS 1967 ROSEN 1967	Australie Taiwan Taiwan Noumea
<u>Rattus rattus alexandrinus</u>	"	ALICATA 1963	Nouvelle-Calédonie

<u>R. rattus diardi</u>	Rongeurs, Muridés Murinés	LIM 1967 KWO et coll. 1968	Malaisie Sarawak Nord de Sumatra Indonésie
<u>R. rattus minda-</u> <u>nensis</u>	"	KUNTZ et coll. 1964	Taiwan
<u>R. rattus sp.</u>	"	CROSS 1967 NISHIMURA et coll. 1964	Taiwan Japon
<u>Rattus tiomanicus</u> <u>jalorensis</u>	"	KWO et coll. 1968	Nord de Sumatra Indonésie
<u>Rattus whiteheadi</u>	"	LIM 1967	Malaisie Sarawak
<u>Suncus murinis</u> <u>ruykiuanus</u>	"	NISHIMURA et coll. 1964	Japon

^ NOTES INTERMEDIAIRES

Les Mollusques, hôtes intermédiaires naturels ou expérimentaux d'Angiostrongylus cantonensis sont des Gastéropodes soit de la sous-classe des Prosobranches (Operculés), soit de l'infra-classe des Pulmonés.

Les espèces ci-après sont groupées d'après les indications qui nous ont été fournies par M. H. CHAVALLIER, Assistant de Malacologie au Museum d'Histoire Naturelle.

Classe : GASTEROPODA

1 - Sous-classe : PROSOBRANCHIA

- Cyclophoridae
- Viviparidae
- Ampullariidae = Pilidae

2 - Sous-classe : EUTHYNEURA

Infra-classe : PULMONATA

a) Ordre ~~de~~ Basommatophora

- Lymneidae
- Physidae

Famille

- Planorbidae
 - = Bulininae
 - = Plesiophysinae
 - = Planorbinae

b) Ordre -- Stylommatophora

Famille

- Zonitidae
- Limacidae
- Ariophantidae
- Subulinidae
- Achatinidae
- Bradybaenidae
- Helicidae
- Veronicellidae

Tableau III

Nom de l'espèce	Classification	Pays d'origine	Référence
<u>Pupina complanata</u> (PEASE)	<u>PROSOBRANCHES TERRESTRES</u> Cyclophoridae	Iles Marshall	ALLICATA 1965 en Micronésie
<u>Bellamya ingallsiana</u> (REEVE)	<u>PROSOBRANCHES FLUVIATILES</u> Viviparidae	Japon, Peak	LIM et coll. 1965, Malaya
<u>Cipangopaludina chinensis</u>	"	Taiwan	CROSS 1967, CHANG et coll. 1968
<u>Sinotaia quadrata</u> (BENSON)	"	Indochine, Chine	CROSS 1967, CHANG et coll. 1968
<u>Marisa cornuarietis</u> (LINNE)	Ampullariidae		RICHARDS et coll. 1967 à Bethesda (Maryland)
<u>Pila ampullacea</u> (LINNE) = (<u>Pila ampullaria</u>)	"	Indonésie	PUNYAGUPTA 1965 en Thaïlande
<u>Pila scutata</u>	"	Java	LIM et coll. 1965 en Malaisie
<u>Lymnea swinhoei</u> 5ADAMS)	Lymneidae		CHANG et coll. 1968
<u>Lymnea volutata</u>	"		RICHARDS et coll. 1967
<u>Physa acuta</u> (DRAPARNAUD)	<u>PULMONES FLUVIATILES</u> Physidae	Europe	YANAGISAWA 1967 au Japon
<u>Physa sp. 5U.S.)</u>	"		RICHARDS et coll. 1967 à Bethesda
<u>Bulinus globosus</u> (MORELET)	Planorbidae (Bulininae)	Afrique	" " "
<u>Bulinus forskalii</u> (EHRENBERG)	"	"	" " "

<u>Bulinus senegalensis</u>	Bulininae	Afrique	RICHARDS et coll. 1967 à Bethesda
<u>Bulinus tropicus</u>	"	"	"
<u>Bulinus truncatus</u>	"	"	"
<u>Indoplanorbis exustus</u> (DESHAYES)	"	Brésil, Inde, S.E. asiatique	LIM et coll. 1965, RICHARDS et coll. 1967
<u>Plesiophysa hubendicki</u>	Planorbidae (Plesiophysinae)	Antilles, Amérique centrale, Brésil	RICHARDS et coll. 1967
<u>Biomphalaria glabrata</u> (SAY)	Planorbidae (Planorbinae)		FLOCH et coll. 1966, COURDURIER et coll. 1967
<u>Biomphalaria Pfeifferi</u> (KRAUSS)	"	Afrique	GUILLON 1965, RICHARDS et coll. 1967
<u>Biomphalaria tenagophila</u> (d'ORBIGNY)	"	Argentine, Uruguay, Brésil, Paraguay	RICHARDS et coll. 1967
<u>Biomphalaria heliophila</u> (d'ORBIGNY)	"	Pérou, Cuba, Porto Rico	"
<u>Biomphalaria obstructa</u>	"	U.S.A, Mexique, Porto Rico, Cuba	"
<u>Biomphalaria pallida</u>	"	Jamaïque, Panama	"
<u>Biomphalaria straminea</u>	"	Vénézuéla, Guyanes, Brésil	"
<u>Drepanotrema simmonsii</u> (FERGUSON et GERHARDT)	"	Porto Rico	"
<u>Ferriassia tenuis</u> (DUNKER) = <u>Planorbis tenuis</u> (DUNKER)	"	Amérique du Nord	"
<u>Helisoma</u> sp.	"		"
<u>Segmentina hemisphaerula</u> (BENSON)	"		"
<u>Zonitoides arborcus</u> (SAY)	Zonitidae	U.S.A.	CHANG et coll. 1968 à Taiwan YANAGISAWA 1967 au Japon

<u>Agriolimnax laevis</u> (MULLER)	Limacidae	Eurasie	ALICATA 1964, en Tavotanga ASH 1967
<u>Girasia peguensis</u> (THEOBALD)	<u>PULMONES TERRESTRES</u> Ariophantidae	Indes	LIM et coll. 1965 à Kuala Lumpur CROOK et coll. 1968 en Thaïlande
<u>Hemiplecta siamensis</u> (PFEIFFER)	"		LIM et coll. 1965 à Malaya
<u>Macrochlamys resplendens</u> (PHILIPPI)	"		LIM et coll. 1965 à Malaya HEYNEMAN et coll. 1967
<u>Microparmarion malayanus</u>	"		YANAGISAWA 1967
<u>Allopeas kyoensis</u> (PILSBRY)	Subulinidae	Japon	ALICATA 1965 en Micronésie
<u>Opeas javanicum</u> (REHVE)	"	Java	ALICATA 1965 en Micronésie
<u>Subulina octona</u> (BRUGUIERE)	"	régions tropicales	FLOCH et coll. 1966 en Guyane française
<u>Achatina fulica</u> (BOWDICH)	Achatinidae	S.E. africain Madagascar	LIM et coll. 1965, ALICATA 1966, KNAPP 1966, NISHIMURA 1966, CROSS 1967... etc.....
<u>Bradybaena similaris</u> (FERRUSSAC)	Bradybaenidae	régions équatoriale et tropicale	ALICATA 1965 en Micronésie ASH 1967, CROSS 1967
<u>Euhadra peliomphala</u> (PFEIFFER)	"	Japon	YANAGISAWA 1967
<u>Euhadra quaesita</u> (DESHAYES)	"	"	"
<u>Fruticicola despecta sieboldiana</u> (PFEIFFER)	"	"	"
<u>Helix aspersa</u> (MULLER)	Jellicidae	Europe	ASH 1967
<u>Veronicella plebeia</u> (FISCHER)	Veronicellidae = Veginulidae	Nouvelle-Calédonie	ALICATA 1965 en Micronésie
= <u>Vaginalus plebeius</u> (FISCHER)	"	"	"

= <u>Angustipes plebeius</u> (FISCHER) = <u>Voginula plebeia</u> (FISCHER)* = <u>Veronicella alte</u> (FERRUSSAC) = <u>Vaginalus alte</u> (FERRUSSAC) = <u>Vaginula alte</u> (FERRUSSAC) = <u>Veronicella leydigii</u> = <u>Veronivella linguaeformis</u> (SEMPER)	Veronicellidae = Veginulidae Veronicellidae " "	Indes, Océanie Guyane	CROSS 1967, ROSEN 1967, ASH 1967 LIM et coll. 1965, NISHIMURA 1966, ASH 1967 HORIO et coll. 1961 à Honolulu FLOCH et coll. 1966, ASH 1967
---	---	-------------------------------------	---

- Des lamellibranches se sont montrés réceptifs à l'infestation expérimentale par Angiostrongylus cantonensis :

- Mercenaria mercenaria - CHENG et BURTON 1965 en Amérique du Nord
- Crassostrea virginica - CHENG et BURTON 1965 en Amérique du Nord
- Venerupis philippinarum - KNAPP et coll. 1967

HÔTES PARATENIQUES ET HÔTES ACCIDENTELS

Hôtes paraténiques -

Quelques hôtes paraténiques sont capables de transporter les larves infestantes d'Angiostrongylus cantonensis. Plusieurs travaux ont été effectués sur ce sujet chez des animaux naturellement infestés et sur des animaux contaminés expérimentalement au laboratoire. De nombreux animaux invertébrés ou vertébrés pourraient servir d'hôtes paraténiques ou d'hôtes de transport. Les espèces connues jusqu'à ce jour sont :

- des Planaires (Geoplanea septemlineata, G. forsterorum, Plathelminthes, Turbellariés). ALICATA, 1964
- des Crevettes (Macrobrachium lar., Crustacés) ALICATA et BROWN, 1962
ROSEN et coll., 1967, WALLACE et ROSEN 1967
- des Crabes (Ocypode ceratophthalma, Crustacés) ALICATA, 1964
- une Grenouille (Hyla aurea) ASH, 1968
- un Serpent (Laticauda colubrina SCHNEIDER) ASH, 1968
- des Poissons (Tilapia mossambica) d'eau douce
(Trachurops crumenophthalmus) marin, WALLACE et coll. 1967

Hôtes accidentels -

- Le Porc et le Veau : ALICATA (1964) observe des larves L_3 d'A. cantonensis chez ces animaux quelques jours après l'infestation. Ensuite JINDRAK et ALICATA en 1968, trouvaient des larves dans l'estomac du Porc, dans les poumons et les cavités péritonéale et thoracique du Veau après 3 jours d'infestation. Les larves à ce stade sont capables de produire l'infestation cérébrale chez le Rat. Trouvées aussi 7 jours à 28 jours après la contamination elles ne produisaient plus l'invasion cérébrale chez le Rat. Dans quelques cas seulement les larves L_4 ont été trouvées dans le cerveau du Porc et du Veau, mais elles se lysent ensuite. En conclusion, le Porc et le Veau se comportent comme des hôtes anormaux pour ce Nématode.
- le Singe (Macacus rhesus) LOISON et coll. 1962, WEINSTEIN et coll. 1963

- l'Homme : NOMURA et coll. 1945, HORIO et coll. 1961, ROSEN et coll. 1962

On peut considérer l'Homme comme un hôte accidentel parce que la larve trouvée dans le cerveau se présente au stade adulte immature (L_5) ; elle est plus grande que celles trouvées chez le Singe.

ETUDE DESCRIPTIVE

Avant de faire une description de l'adulte d'Angiostrongylus cantonensis nous rappellerons très brièvement sa position systématique dans la classification des Nématodes, parasites des animaux domestiques.

Phylum : Némathelminthes SCHNEIDER, 1873

Classe : Nematoda RUDOLPHI, 1808

Sous-classe : Phasmodia CHITWOOD et CHITWOOD, 1933

Ordre : Rhabditida CHITWOOD, 1933

Sous-ordre : Strongylata RAILLIET et HENRY, 1934

Super famille : Metastrongyloidea LANE, 1917

Famille : Mestastromylidae LEIPER, 1908

Genre : Angiostrongylus KAMENSKY, 1905

ESPECES

Le genre Angiostrongylus créé par KAMENSKY en 1905, comprend actuellement 16 espèces décrites dans différents pays. L'espèce type correspondant à ce genre, A. vasorum, a été trouvée, en 1853, à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse par SERRES et décrite sous le nom de Strongylus vasorum par BAILLET, en 1862-1866.

Nous indiquons ci-après les 16 espèces connues :

A. vasorum (BAILLET, 1866) - France

A. subcrenatus RAILLIET et HENRY, 1913 - Congo belge

A. raillieti TRAVASSOS, 1927 - Brésil

A. tateronae BAYLIS, 1928 - Afrique de l'Ouest

A. cantonensis (CHEN, 1935) - Chine

A. ten YAMAGUTI, 1941 - Japon

A. gubernaculatus DOUGHERTY, 1946 - Californie

- A. soricis SOTTYS, 1953 - Pologne
A. blarini OGREN, 1954 - Illinois
A. chabaudi BIOCCA, 1957 - Italie
A. sciuri MERDIVENCI, 1964 - Turquie
A. costaricensis MORERA, 1967 - Costa-Rica
A. michiganensis ASH, 1967 - Michigan
A. maskerrasae BHAIBULAYA, 1968 - Australie
A. sandarsae ALICATA, 1968 - Mozambique
A. dujardini DOBY, DROZDZ et BEACOURNU, 1970 - France

MORPHOLOGIE

Angiostrongylus cantonensis est un Nématode allongé, à corps cylindrique, atténué aux deux extrémités.

Le mâle mesure de 15,5 à 22 mm de longueur sur 0,25 à 0,35 mm de diamètre et la femelle de 18,5 à 33 mm sur 0,28 à 0,5 mm. Dans la région antérieure la bouche s'ouvre directement à l'extérieur, sans capsule buccale, mais on peut observer la présence de trois petites dents triangulaires à ce niveau. L'oesophage qui fait suite à l'orifice buccal mesure de 0,29 à 0,35 mm de longueur sur environ 0,05 mm dans sa largeur maximale. Le pore excréteur s'ouvre juste à la jonction de l'oesophage et de l'intestin. La cuticule est transparente.

Le mâle de couleur blanchâtre présente à son extrémité postérieure une bourse caudale dirigée ventralement. Il possède deux spicules larges, sensiblement égaux, finement striés et mesurant environ 1,2 mm. Le rayon ventro-ventral est attaché avec le ventro-latéral jusqu'aux deux-tiers de sa largeur ; les rayons latéraux sortent ensemble ; le latéro-ventral est très court et épais ; le dorso-latéral est simple et le dorso-dorsal est court et épais et trois petites digitations le terminent. Il n'y a pas de gubernaculum.

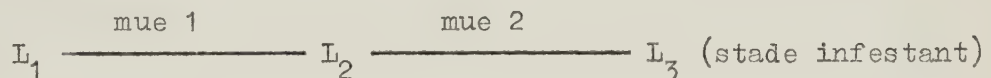
La femelle nettement plus grande que le mâle apparaît rouge sombre. Ceci est dû à la transparence de la cuticule qui laisse voir l'intestin rempli de sang, autour duquel s'enroulent en spirale les

tubes génitaux. L'extrémité caudale se termine en pointe ; la vulve, antérieure à l'anus est située à 0,25 - 0,28 mm de l'extrémité postérieure. Les femelles sont ovipares.

CYCLE EVOLUTIF

Les parasites adultes vivent dans le coeur droit et les ramifications de l'artère pulmonaire du Rat, où les femelles pondent des oeufs embryonnés. Ceux-ci sont emportés par le courant sanguin et s'arrêtent dans les artérioles où ils évoluent pour donner une larve du premier âge. Celle-ci traverse la paroi des capillaires et pénètre dans les alvéoles. De là, elle continue sa migration vers les voies aérifères, arrive au pharynx, où elle est déglutie et s'élimine dans les matières fécales du Rat après avoir traversé le contenu intestinal. Elle mesure environ 0,27 à 0,30mm et présente une queue pointue et courte ; l'oesophage parfois dilaté en région antérieure n'est jamais rhabditoïde.

Cette larve du premier âge expulsée dans le milieu extérieur pénètre activement ou est ingérée par un hôte intermédiaire dans l'organisme duquel elle poursuit son évolution. Après deux mues successives elle arrive au stade L_3 infestant.



Les larves s'enkystent dans différentes parties de l'organisme de l'hôte, notamment dans les couches musculaires où elles attendent désormais pour continuer leur évolution de pénétrer dans l'hôte définitif, le Rat ou d'autres Rongeurs.

L'hôte définitif s'infeste en mangeant l'hôte intermédiaire. Les larves au 3ème âge sont libérées dans l'extomac au cours de la digestion des tissus du Mollusque ; elles descendent dans l'intestin grêle et traversent ensuite la muqueuse. Elles atteignent le foie en empruntant le

système porte. De cet organe elles gagnent les poumons. D'autres larves pénètrent dans le système lymphatique et migrent à travers les ganglions. Les larves sont entraînées par le courant sanguin vers le foie, le coeur, le rein et les poumons. Elles quittent la circulation et pénètrent dans le tissu nerveux; notamment dans le cerveau du Rat. Le parasite y séjourne environ 28 jours pour évoluer et les jeunes adultes immatures arrivent dans le coeur droit, l'artère pulmonaire et ses ramifications, leur habitat définitif.

RECHERCHES PERSONNELLES

Nous avons étudié expérimentalement le cycle complet d'Angiostrongylus cantonensis au Laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (France).

Pour infester des Rats blancs, hôtes définitifs normaux, nous avons utilisé la Planorbe : Biomphalaria glabrata (SAY) (= Australorbis glabratus) comme hôte intermédiaire.

Nous rappellerons brièvement la technique utilisée pour la réalisation de ce cycle et nous résumerons les caractéristiques des migrations des larves d'A. cantonensis dans l'organisme des Mollusques et dans celui des Rats.

Nous avons tenté l'infestation du Chien et du Chat, mais nos essais se sont révélés infructueux. Cependant il faut remarquer que le Professeur GUILLON avait, en 1965, réussi à obtenir un très petit nombre de larves du premier stade dans les excréments de deux jeunes chiens contaminés 51 jours plus tôt. La même année, D.E. WOOD obtient le cycle complet chez un autre Carnivore : La Mangouste (Herpestes urva) à Taiwan.

A - Infestation de l'hôte intermédiaire

B. glabrata est un Mollusque dulçaquicole des régions tropicales. Des élevages sont entretenus au Laboratoire dans des bacs en verre remplis d'eau de source que nous renouvelons tous les 15 jours. Les Planorbes reçoivent, quotidiennement, pour nourriture, des feuilles fraîches de salades (laitue). La température de l'eau est maintenue de façon constante à 25-27° grâce à une résistance électrique et l'eau est aérée et constamment filtrée.

Cette atmosphère artificielle est tout à fait propice à l'élevage des Mollusques non infestés, aux larves L_1 du parasite ainsi qu'aux Mollusques infestés.

Nous choisissons les jeunes Mollusques de 1 cm de diamètre, obtenus en deux mois environ, et nous procédons de la manière suivante. Nous déposons des excréments de Rats infestés, renfermant un grand nombre de larves L_1 dans un morceau de gaze, lui-même introduit dans un entonnoir maintenu par un support. Ce dernier est muni à sa partie inférieure d'un court tube de caoutchouc, fermé par une pince de Mohr. L'entonnoir est ensuite rempli d'eau du robinet et laissé pendant quelques temps (au minimum 4 heures et au maximum une nuit ou une journée) pour obtenir de nombreuses larves vivantes. Le liquide accumulé dans le tube d'écoulement de l'entonnoir est recueilli et centrifugé à 1500 ou 2000 tours pendant 5 minutes. Les larves sont alors comptées selon la technique de la dilution.

Pour l'infestation ces larves sont mises en contact avec les Planorbes dans un petit cristalliseur contenant de l'eau à la température du laboratoire pendant une durée de temps variant de 6 heures à une journée et les Mollusques sont ensuite replacés dans les bacs. Un peu de nourriture (morceau de salade, par exemple), dans le cristalliseur facilite la contamination.

La larve au premier stade (Fig. 1, 2, 3) est très active, mais après la pénétration dans les tissus musculaires du Mollusque elle s'immobilise, prend une position incurvée. L'intestin se charge de cellules de réserve, devient plus sombre et la larve grossit progressivement jusqu'à la formation d'une première peau de mue qui ne disparaît d'ailleurs pas. Il y a ensuite formation d'une seconde peau qui recouvre la première (Fig. 4, 5, 6). A la fin de l'évolution la larve L_3 sort de ses deux exuvies, migre et s'enroule pour s'enkyster dans les tissus musculaires des Mollusques. Ainsi elle peut rester vivante pendant plusieurs mois (Fig. 7, 8 9).

Le développement dépend du degré thermique. Nous avons effectué nos expériences à diverses températures : notamment à 25-27° et à 20° C.

Les caractères morphologiques de cette larve paraissent être identiques à ceux de la larve décrite par MACKERRAS et coll. en 1955.

En général avec 20.000 larves L_1 pour 20 Mollusques nous avons obtenu environ 500 larves L_3 par individu. Mais il faut noter que lors de ces infestations nous perdons à peu près 50% des Planorbes.

Nous pouvons résumer nos observations comme suit :

1° - Essais à la température de 25-27° C

Tableau IV

ancienneté de l'infestation des Mollusques	Observations
24 heures	La larve est très calme, ne remue que très peu
1-4 jours	Toutes les larves sont enroulées dans le tissu musculaire
5 jours	La larve a accumulé des cellules de réserve. Son intestin est beaucoup plus sombre.
6 jours	La queue s'allonge. La première peau de mue apparaît. La durée de ces transformations est de 8 à 9 jours.
10 jours	La seconde peau de mue apparaît. L'intestin reste foncé et la queue s'allonge davantage.
13 jours	24% des larves acquièrent leur deuxième peau de mue et arrivent au stade 3. 76% des larves sont encore au 2ème stade.
22 jours	100% des larves sont au stade 3 dans des réactions tissulaires de l'hôte.

2° - Essais à la température de 20° C

L'évolution est plus longue à cette température. La larve reste dans la première peau de mue jusqu'au 19ème jour. Le 20ème, on observe 16% des larves avec leur deuxième exuvie et ce n'est que le 28ème jour que le stade 3 est apparent.

Dans ces conditions de température toutes les larves atteignent le stade L_3 entre 40 et 41 jours d'infestation. Les différences sont présentées dans le graphique n° 1.

B - Infestation de l'hôte définitif

1° - Le RAT

Nous avons utilisé la variété albinos de Rattus norvegicus adaptée au laboratoire.

Notre but était double : observer les migrations dans l'organisme des Rongeurs, étudier les différents états morphologiques, et obtenir des adultes pour servir à la préparation d'un antigène.

Nous avons procédé de la manière suivante :

après avoir écrasé les Mollusques entre deux lames, on enlève soigneusement les morceaux de coquille ; on les sectionne et les fragments sont placés dans des morceaux de gaze ou mieux de bas nylon. On plonge le tout dans une solution de pepsine (pepsine: 5 cg, H Cl : 5ml, eau distillée : 1000 ml) que l'on maintient à 37° C, au bain-marie, pendant environ une heure. Les tissus digérés libèrent les larves infestantes qui sont recueillies par la méthode de Baermann, et sont ensuite comptées. Le nombre de larves choisi est administré aux Rats grâce à une seringue à tuberculine munie d'une aiguille courbe dont l'extrémité rodée est introduite avec précaution dans le pharynx par une commissure labiale. On laisse s'écouler lentement le liquide (environ 1 à 2 ml) pour permettre à l'animal de déglutir.

Par cette méthode nous avons infesté avec des doses variables

115 sujets. La proportion entre les larves ingérées et les adultes retrouvés dans les divers organes est indiquée dans les tableaux IV et V ci-inclus. Les premières larves sont observées dans le cerveau des Rats entre 4 et 6 h30 après l'infestation. Elles y séjournent pour se transformer jusqu'au 36ème jour (voir tableau VI). Les lésions hémorragiques des poumons apparaissent au bout d'une heure et la congestion s'observe après 15 h 30.

Sur un lot de 13 rats qui ont reçu oralement 1000 larves L_3 nous avons pu observer les faits suivants : 48 heures après la contamination ils entrent dans un état comateux et deux d'entre eux seulement survécurent durant 14 jours à l'infestation expérimentale.

Tableau V

Premier lot de 13 rats infestés par 1000 larves L_3

de l'infestation	estomac	intestin grêle	gros intestin	ganglions	foie	rate	reins	cerveau	coeur	artères pulmonaires	TOTAL
1/2 h	572	19	0	1	0	0	1	0	0	2	595
1 h	12	20	0	1	100	0	4	0	0	27	164
2 h	243	68	0	8	444	0	2	0	0	72	837
3 h	225	43	0	70	380	3	2	0	1	186	910
4 h	40	60	6	10	502	0	0	0	0	42	660
h 30	35	8	3	23	189	1	3	2	0	69	333
8 h	18	6	0	6	147	0	4	2	1	102	286
5h30	1	5	0	0	9	0	18	5	1	11	50
4 h	1	0	0	5	5	0	17	22	0	76	126
8 h	1	0	0	30	3	0	8	105	0	3	150
5 j	0	0	0	0	0	0	0	196	0	0	196
1 j	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	400

Quand nous avons essayé d'administrer des doses de 500, 250, 220, 200, 150, 100 et 80 larves L_3 nous avons constaté que les Rats tolèrent difficilement une dose supérieure à 80 ou au plus 100 larves infestantes. Au dessus de cette dose la mortalité est en effet évaluée à 100% entre le 10ème et le 57ème jours après l'infestation selon les quantités ingérées.

Des immatures peuvent encore se trouver dans le cerveau au 36ème jour mais dans ce cas les femelles sont encore immatures contrairement aux femelles ovigères que l'on trouve dans l'artère pulmonaire et le coeur au même âge. Les mâles ont leur bourse caudale bien développée.

Le nombre des immatures et des adultes que l'on retrouve dans ces trois derniers organes au bout de 20 à 57 jours est indiqué dans le Tableau VI.

Au cours de cette étude de la biologie d'Angiostrongylus cantonensis il a été possible de suivre les réactions humorales des Rats infestés. Des étalements de sang furent effectués qui nous permirent après coloration au May-Grünwald-Giemsa, d'établir la courbe éosinophilique présentée dans le graphique n° 1.

Le premier sommet atteint 26% le 8ème jour, époque à laquelle les larves envahissent le cerveau et le deuxième à 36% le 33ème jour quand les larves traversent les méninges et gagnent l'artère pulmonaire et le coeur. Entre le 9ème et le 36ème jours les larves s'accumulent à la surface du cerveau pour muer une troisième fois, ce qui explique, vraisemblablement, le tracé oscillant de la courbe.

Le taux d'éosinophiles varie de 1 à 4% chez le Rat témoin, durant l'expérience.

Tableau VI

Nombres moyens de parasites trouvés dans des lots
d'au moins 5 Rats, aux diverses époques des migrations

ancienneté de l'infes- tation en jours	Parasites immatures et adultes dans		
	cerveau	coeur	artères pulmonaires
21	26	0	0
27	21 à 72	18 à 68	38 à 83
28	19 à 81	10 à 44	38 à 149
29	22 à 94	11 à 25	38 à 106
30	5 à 29	5 à 69	35 à 235
31	3 à 8	15 à 98	28 à 104
32	6 à 7	13 à 78	19 à 101
33	0 à 6	44 à 60	42 à 89
34	0 à 6	11 à 63	37 à 133
35	0 à 5	5 à 59	25 à 98
36	1 à 3	3 à 60	61 à 103
37	0	2 à 31	62 à 180
41	0	15 à 23	63 à 83
42	0	15 à 33	38 à 104
43	6	14 à 25	63 à 74
44	0	16 à 26	18 à 99
45	0	17 à 34	38 à 118
46	0	15 à 32	30 à 112
57	0	12 à 27	68 à 87

Dans ces expériences le pourcentage d'infestation
a varié entre 35 et 50.

2° - Le CHIEN et le CHAT

Ces animaux ne sont pas naturellement réceptifs à A. cantonensis. Cependant nous avons essayé de les infester afin de suivre leurs réactions et les modifications humorales.

L'infestation a été pratiquée comme précédemment en administrant un certain nombre de larves comptées dans des fragments de Mollusques. On procède un peu différemment ; on introduit une suspension de larves dans des capsules de gélatine, après digestion peptique (surtout pour le Chat).

L'infestation est de toute façon pratiquée par voie orale et sur des animaux à jeun qui ont reçu, au préalable, un tranquillisant, pour éviter les vomissements (1ml/kg de maléate d'acépromazine). Toutefois certains sujets, plus sensibles, rejettent les débris de Mollusques et il faut recommencer l'administration.

Nous avons utilisé 5 chiots (4 mâles et une femelle), dont un témoin.

Les résultats sont indiqués dans le tableau VII.

Dans tous les cas la paralysie commence par les membres postérieurs le 7ème jour et les animaux résistent en général jusqu'au 10ème jour. Le premier chien, après cette période s'est rétabli le 11ème jour tandis que les autres (II-III-IV) sont morts.

Avant que les animaux tombent dans le coma ils continuent à se nourrir et à se déplacer difficilement, mais restent prostrés dans un coin. S'ils surmontent cette période, ils guérissent.

Le nombre des éosinophiles sanguins commence à augmenter vers le 5ème jour (graphique 1) et reste à 20% jusqu'au 17ème jour. Puis il revient à la normale le 22ème jour. Au moment de la mort on ne trouve plus d'éosinophiles dans le sang.

Le taux des éosinophiles varie de 2 à 7% chez le Chien témoin.

Tableau VII

Désignation des animaux	Age des animaux	Poids des animaux	Nombre de larves L ₃ ingérées	ancienneté de l'infestation	Nombre de larves L ₄ trouvées dans le cerveau	Observations
P _I mâle	71 j	4,3kg	2000			8ème jour : premiers signes 9ème jour : paralysie complète. réaction i/d très positive 10ème jour : tous les signes pathologiques ont disparu
P _{II} ♀	76 j	3 kg	4000	10 j	43	7ème jour : premiers signes 8ème jour : paralysie du train postérieur 9ème jour : paralysie complète 10ème jour : état comateux 11ème jour : <u>mort</u>
P _{III} ♀	83 j	5 kg	1500	8 j	74	7ème jour : début de paralysie du train postérieur absorbe sa nourriture et boit, mais ne peut se déplacer. 8ème jour : paralysie complète - état comateux <u>mort</u> (Fig. 10)
P _{IV} ♀	83 j	3 kg	1500	13 j	3	7ème jour : abattement - prostration 8ème jour : paralysie du train postérieur - mange, boit, se déplace un peu. Etat stationnaire pendant 72 heures. 11ème jour : les signes s'accroissent Se déplace difficilement en titubant. Plaintes. Pose sa tête contre le mur ou entre ses pattes antérieures. 12ème jour : <u>mort</u> dans le coma
P _T ♀	71 j	4 kg	TEMOIN			aucune manifestation clinique

Nous n'avons eu à notre disposition qu'une chatte adulte, mais les réactions sanguines ont été identiques à celles des chiots. Elles sont présentées dans le tableau VIII. Le taux des éosinophiles, comme le montre le graphique n° 1 commence à augmenter à partir du 5ème jour et chez le chien, pour arriver à un taux maximum de 19% le 13ème jour et redescendre à la normale le 33ème jour. Durant les 54 jours d'observation nous n'avons trouvé aucune larve L_1 dans les fèces de cette Chatte.

Tableau VIII

Réactions hématologiques de la Chatte

Dates des examens	ancienneté infestation	Neutrophiles	Eosinophiles	grands lymphocytes	petits lymphocytes	Monocytes	Nombre de globules		Vitesse de sédimentation		
							rouges par mm^3	blancs par mm^3	1 h	2 h	24 h
10-09-69	0	51	5	39	3	2	2.250.000	9.800	63mm	85mm	95mm
19-09-69	0	52	5	39	3	1	1.900.000	8.870	80mm	86mm	95mm
24-09-69	5j	35	7	52	5	1	1.480.000	7.230	72mm	95mm	102mm
2-10-69	13j	47	19	31	3	3	2.080.000	3.140	65mm	85mm	102mm
8-10-69	19j	49	14	30	7	0	3.480.000	6.280	40mm	55mm	80mm
15-10-69	26j	52	8	30	5	5	3.020.000	11.650	80mm	90mm	95mm
22-10-69	33j	59	5	31	5	0	1.890.000	11.750	96mm	110mm	120mm
29-10-69	40j	71	4	23	2	0	2.270.000	11.380	70mm	88mm	91mm
5-11-69	47j	34	4	52	4	6	1.590.000	10.750	80mm	110mm	120mm
12-11-69	54j	42	4	42	2	10	1.830.000	7.690	8mm	30mm	50mm

DISCUSSION

Nos expériences sur la biologie d'Angiostrongylus cantonensis sont en accord avec les travaux entrepris par plusieurs chercheurs utilisant le Mollusque Biomphalaria glabrata comme hôte intermédiaire et le Rat, Rattus norvegicus, comme hôte définitif (RICHARDS 1963, FLOCH et coll. 1966, COURDURIER et coll. 1967, RICHARDS et coll. 1967).

Le développement des larves dans le tissu musculaire des Mollusques varie avec le degré thermique. A une température relativement basse de 20° C le développement est complet le 42ème jour, mais à la température de 25-27° C la totalité des larves a atteint le stade L₃ le 22ème jour. Le Professeur GUILHON, en 1965, observe l'apparition des larves L₃, à la température de 25-26° C le 17ème jour après l'introduction des larves L₁ dans les bacs contaminés. A haute température le développement des larves est accéléré, mais beaucoup de Mollusques meurent, tandis qu'à basse température le développement des larves est retardé, mais les Mollusques résistent mieux.

MACKERRAS et SANDARS, en 1955, rapportent leurs observations sur le cycle évolutif de ce Nématode. Les larves du 3ème âge, absorbées par le Rat, sont libérées de leur fourreau dans l'estomac du Rongeur 40 minutes après. Elles apparaissent dans l'intestin grêle (région de l'iléon) 2 à 3 heures plus tard. Elles ont été retrouvées dans le mésentère de cette région. Quatre heures après l'infestation elles sont observées dans le sang du ventricule droit et environ 1 heure 30 plus tard elles sont présentes dans la veine porte et la veine cave inférieure. Le sang qui sort du foie et des poumons en contient un grand nombre. Elles sont trouvées également dans le tissu hépatique, mais elles sont absentes du parenchyme pulmonaire.

Sept heures après, les parasites sont trouvés dans le liquide céphalo-rachidien, la moelle épinière et les hémisphères cérébraux. Dans l'encéphale elles évoluent, effectuant la troisième (6-8 jours) et la 4ème mues (11-13 jours) au terme desquelles apparaissent les jeunes adultes. Ces derniers quittent le cerveau pour gagner le coeur et les artères pulmonaires en empruntant vraisemblablement les veines jugulaires externes (28-31 jours). On ne retrouve plus aucun Nématode dans le cerveau après le 31ème jour.

COURDURIER et coll., en 1964, signalent que les larves sont rapidement libérées au niveau de l'estomac. Elles gagnent ensuite l'iléon, les veines du mésentère et en 24 heures elles atteignent le cerveau. Vers le 13ème jour s'opère une nouvelle mue et le 28ème elles sont devenues de jeunes adultes immatures qui migrent vers les poumons. Ces auteurs n'indiquent pas le trajet emprunté.

ALICATA en 1965, trouve les premières larves dans le cerveau d'un Rat, âgé d'un jour, 7 heures après son infestation.

JINDRAK (1968) observe l'apparition des larves dans les différents organes de l'hôte définitif une heure après son infestation. Elles sont présentes surtout dans l'estomac, l'intestin, le foie, les ganglions mésentériques et les poumons. Il observe les larves dans le cerveau 4 heures après l'ingestion. L'auteur pense que les parasites migrent par la voie sanguine dans tous les organes du Rat, mais il est possible qu'ils atteignent le cerveau par la voie nerveuse.

Pour notre part nous avons retrouvé 30 minutes après l'absorption de larves L_3 par des Rats, les Nématodes dans les poumons (2), les reins (1), les ganglions mésentériques (1), l'intestin grêle (19), et l'estomac (572), tandis que des petits points hémorragiques apparaissent dans les poumons au bout de une heure et l'accumulation de liquide dans la cavité pulmonaire est nette après 3 heures d'infestation. Les poumons deviennent très congestifs 15 h 30 plus tard, et le cerveau 24 heures après. On peut observer des larves dans cet organe entre 4 et 6 h 30, où leur accumulation augmente progressivement. Les larves y restent pour y continuer leur évolution jusqu'au 36ème jour. A ce moment, les adultes immatures, gagnent l'oreillette droite, le ventricule droit, puis l'artère pulmonaire. Au 37ème jour les dernières migrations sont terminées et le cerveau est complètement libéré. Les lésions de l'encéphale s'estompent, mais les poumons réagissent en doublant et triplant leur volume, s'épaississent et révèlent les lésions de pneumonie diffuse. Quelquefois les lobes pulmonaires sont gravement atteints, mais on ne trouve aucun parasite dans les lésions de congestion et d'hémorragies. Dans ce cas les adultes préfèrent se loger dans les parties moins détériorées ou dans l'artère pulmonaire ou le coeur lui-même. Macroscopiquement cet organe apparaît normal, quelquefois un peu dilaté.

Le Chat et le Chien présentent tous les symptômes de la méningite à éosinophiles pendant environ deux semaines. Chez ces animaux le taux des éosinophiles commence à augmenter à partir des 4^{ème}-5^{ème} jours et les symptômes de paraplégie du train postérieur se révèlent à partir du 7^{ème} jour (tableau VII).

Notre premier essai d'infestation d'un Chat par ce Nématode nous a permis de constater une augmentation progressive des éosinophiles jusqu'au taux de 19%, le 13^{ème} jour, pour redescendre petit à petit au taux initial de 4%. La vitesse de sédimentation des hématies, et les chiffres totaux et différentiels des cellules sanguines se révèlent très variables (tableau VIII). A partir du 17^{ème} jour, le Chat se rétablit et ne présente plus aucun symptôme clinique.

Trois Chiens sur les quatre utilisés sont morts entre les 10^{ème} et 12^{ème} jours après l'infestation; le quatrième n'élimina pas de larves dans ses fèces pendant 67 jours alors que le Professeur GUILHON, en 1965, put observer des larves dans les fèces des deux Chiens infestés 51 jours plus t^{ôt}. L'éosinophilie se traduit par un maximum de 20% le 14^{ème} jour et oscille entre 4-5%. Les 3 autres Chiens qui ne supportèrent pas une quantité de 1500 à 4000 larves L₃ révélèrent les mêmes symptômes de paralysie et d'éosinophilie et l'issue fatale se produisit les 11 ou 12^{èmes} jours. A l'autopsie, le cerveau contenait des larves L₄ vivantes (Fig. 11).

En comparant les taux d'éosinophiles du Rat, du Chat et du Chien nous pouvons constater qu'ils commencent à augmenter peu de temps après l'infestation pour atteindre le maximum les 13^{ème} et 14^{ème} jours chez le Chat et le Chien, respectivement, pour redescendre à la normale tandis que les taux varient beaucoup chez le Rat entre le 5^{ème} et le 20^{ème} jours. Le premier sommet atteint 26% le 8^{ème} jour quand les larves s'accumulent dans le cerveau. Le deuxième se manifeste à 37% le 33^{ème} jour quand la majorité des larves quittent le cerveau et arrivent dans le coeur et les artères pulmonaires et leurs ramifications. La variation des taux est fonction de la migration des larves (COURDURIER et coll. 1966).

Nous pensons que le Rat, hôte spécifique de ce Nématode, révèle cette réaction normale pendant toutes les migrations internes des larves tandis que le Chat et le Chien manifestent une réaction importante, mais temporaire, sans doute parce que leur organisme n'est pas favorable au développement d'Angiostrongylus cantonensis.

Après un certain temps les larves sont vraisemblablement lysées et digérées. La mortalité des Chiens est peut être provoquée par la migration cérébrale et la production de toxines par les parasites. Il faut noter que l'ingestion de 2000 larves L_3 est bien tolérée par le Chat tandis que celle de 1500 larves infestantes est fatale pour le Chien. Ce Carnivore semble donc être plus réceptif que le Chat.

Cette étude serait intéressante à poursuivre ultérieurement.

Tous les auteurs qui ont étudié cette éventuelle réceptivité ne sont pas d'accord. Le Rat est l'hôte spécifique, normal, habituel d'Angiostrongylus cantonensis. Dans la nature un grand nombre de Ronggurs du genre Rattus, mais aussi d'espèces voisines (Bandicota) hébergent le Nématode.

On connaît également des hôtes paraténiques, hôtes d'attente, mais aussi des hôtes inhabituels, parasités erratiquement et qui représentent des impasses pour l'évolution, tel l'Homme, qui s'infeste accidentellement. Dans de telles conditions le parasite est perdu pour l'espèce, car il a dépassé le stade L_3 infestant.

Expérimentalement, un grand nombre d'animaux sont réceptifs (Souris, Rat, Lapin, Porc, Veau...), mais on n'a jamais pu obtenir la migration complète et la maturité sexuelle, avec élimination des larves L_1 , sauf deux exceptions : l'infestation du Chien par le Professeur GUILHON à Alfort (France) et celle de la Mangouste (Herpestes urva) par le Docteur D.E. WOOD, à Formose.

Les travaux du Professeur GUILHON ont été contestés par ROSEN et coll., en 1970, qui pensent qu'une erreur a pu se produire, puisque au Laboratoire où nous travaillons, les deux espèces d'Angiostrongylus existent. Leurs réactions son compréhensibles, mais des arguments irréfutables plaident en faveur de cette réussite.

Les deux chiens, en mauvais état, âgés de 8 mois, une femelle pesant 10 kg et un mâle 15 kg, reçurent le 15 mars 1965 dans de la viande hachée des Mollusques renfermant des larves L_3 . Les animaux furent suivis régulièrement et leurs fèces examinées deux fois par semaine pendant les 30 premiers jours, puis toutes les 48 heures jusqu'au 45ème jour et enfin tous les jours jusqu'au 5 mai 1965. A cette époque un petit nombre de larves L_1 sont observées dans les fèces des deux animaux infestés 51 jours auparavant.

Des examens copposcopiques effectués plusieurs fois par semaine permirent de mettre en évidence des larves L_1 vivantes en faible quantité, jusqu'au 15 juin, date à partir de laquelle leur nombre va en décroissant jusqu'à être éliminées, mortes ou en voie de lyse.

L'autopsie des chiens, alors sacrifiés, ne permit pas de retrouver les Nématodes adultes. Cette dernière constatation a permis à l'auteur d'émettre l'hypothèse suivante : les adultes d'A. cantonensis hébergés par un hôte, non spécifique, étant soumis constamment aux réactions de défenses de l'organisme, leur vitalité diminue assez rapidement et leur vie est plus ou moins brève suivant les hôtes, leur âge et leur résistance individuelle alors qu'Angiostrongylus vasorum est constamment et régulièrement retrouvé pendant plusieurs années.

D'autres infestations de chiens plus âgés ou plus jeunes, ne réussirent pas.

A la même époque (1965) un animal d'une autre espèce fut utilisé à Taïwan. D.E. WOOD infesta une Mangouste (Herpestes urva) par 1000 larves L_3 d'Angiostrongylus cantonensis obtenues par la digestion peptique de Biomphalaria glabrata et observait les larves L_1 dans les fèces 33 jours après la contamination. L'auteur tuait la Mangouste 75 jours plus tard et trouvait 5 adultes d'A. cantonensis dans le coeur droit et plus de 100 parasites morts dans l'artère pulmonaire et ses ramifications. Il remarqua aussi de nombreux oeufs embryonnés et des larves L_1 , très actives dans les poumons.

L'auteur pense, comme le Professeur GUILHON qu'A. cantonensis peut se développer chez plusieurs hôtes expérimentaux comme chez Herpestes urva.

Durant nos essais personnels nous n'avons pas constaté d'évolution complète jusqu'à la maturité sexuelle d'Angiostrongylus cantonensis dans l'organisme de chiens ^agés de 2 à 3 mois, en très bon état ; mais nous avons pu observer les symptômes de la méningite à éosinophiles vers les 6ème-10ème jours qui provoquaient chez certains d'entre eux la mort dans le coma.

CONCLUSION

Cette étude sur la biologie d'A. cantoniensis dans le Mollusque Biomphalaria glabrata (hôte intermédiaire expérimental) et dans l'organisme du rat (hôte définitif habituel) a permis de mettre en évidence d'une part, les différents stades de développement du parasite et leur localisation dans les deux hôtes, et d'autre part l'étude de sa migration dans le système nerveux du chien et du chat (hôtes inhabituels) à l'origine du syndrome méningite à éosinophiles.

Mollusques

La larve du premier stade est très active, mais après sa pénétration dans le tissu musculaire du Mollusque elle s'enroule, mue deux fois et devient larve L_3 . L'évolution est rapide à la température de 25 à 27°C mais plus lente à 20° C ou moins.

Rat

Le Nématode pénètre par ingestion dans l'hôte définitif alors qu'il est au 3ème stade de développement larvaire (stade infestant). Il se débarrasse de sa peau de mue dans l'estomac, puis traverse la paroi du tube digestif. Il aboutit ensuite dans les ganglions mésentériques, le foie, la rate, les reins, le coeur, les poumons et enfin dans le cerveau où se produisent les 2 mues qui aboutissent au stade adulte immature. Après leur séjour dans le cerveau les jeunes adultes migrent de nouveau et arrivent dans le coeur droit, l'artère pulmonaire et ses ramifications, par la veine jugulaire droite. Des oeufs embryonnés pondus dans l'artère pulmonaire sont emportés par le courant sanguin et s'arrêtent dans les artérioles où ils éclosent pour donner une larve L_1 qui arrive au pharynx où elle est déglutie et éliminée avec les excréments.

La migration d'A. cantonensis est très rapide : en 30 minutes les larves arrivent dans les ganglions, les reins, entre 4 et 6 heures dans les poumons. Au bout de 48 heures elles sont presque toutes dans le cerveau pour y séjourner en moyenne 25 à 28 jours et possiblement jusqu'au 36ème jour, alors que les jeunes adultes commencent à descendre dans le coeur et l'artère pulmonaire entre le 21ème et le 27ème jours.

Pendant la migration des larves, la rat révèle un premier taux d'éosinophiles à 26% le 8ème jour, moment où la plupart des larves se trouvent dans le cerveau et un deuxième à 36% le 33ème jour, lorsque les immatures se présentent dans le coeur et l'artère pulmonaire. Le taux maximum d'éosinophiles se trouve à 7% à partir du 60ème jour.

Réactions du chien et du chat.

Le chien après son infestation révèle rapidement les symptômes de méningite à éosinophiles par un taux d'éosinophiles à 20% et le 16ème jour il redevient normal comme celui du témoin. Généralement la parésie du train postérieur s'installe le 7ème jour pour devenir générale le 8ème jour. Si l'animal ne surmonte pas cette crise il meurt peu de temps après. A l'autopsie les larves L_4 sont présentes dans le cerveau. S'il ne meurt pas, il se rétablit progressivement, mais ne révèle pas de larves d'A. cantonensis dans les fèces, ni d'adultes à l'autopsie effectuée deux mois après l'infestation.

Le chat présente des symptômes de parésie et de méningite à éosinophiles comme le chien. Ni larves L_4 , ni adultes, ne sont trouvés dans l'organisme du chat. Il ne nous a pas été possible de vérifier la présence des larves L_4 dans le cerveau, n'ayant qu'une chatte à notre disposition.

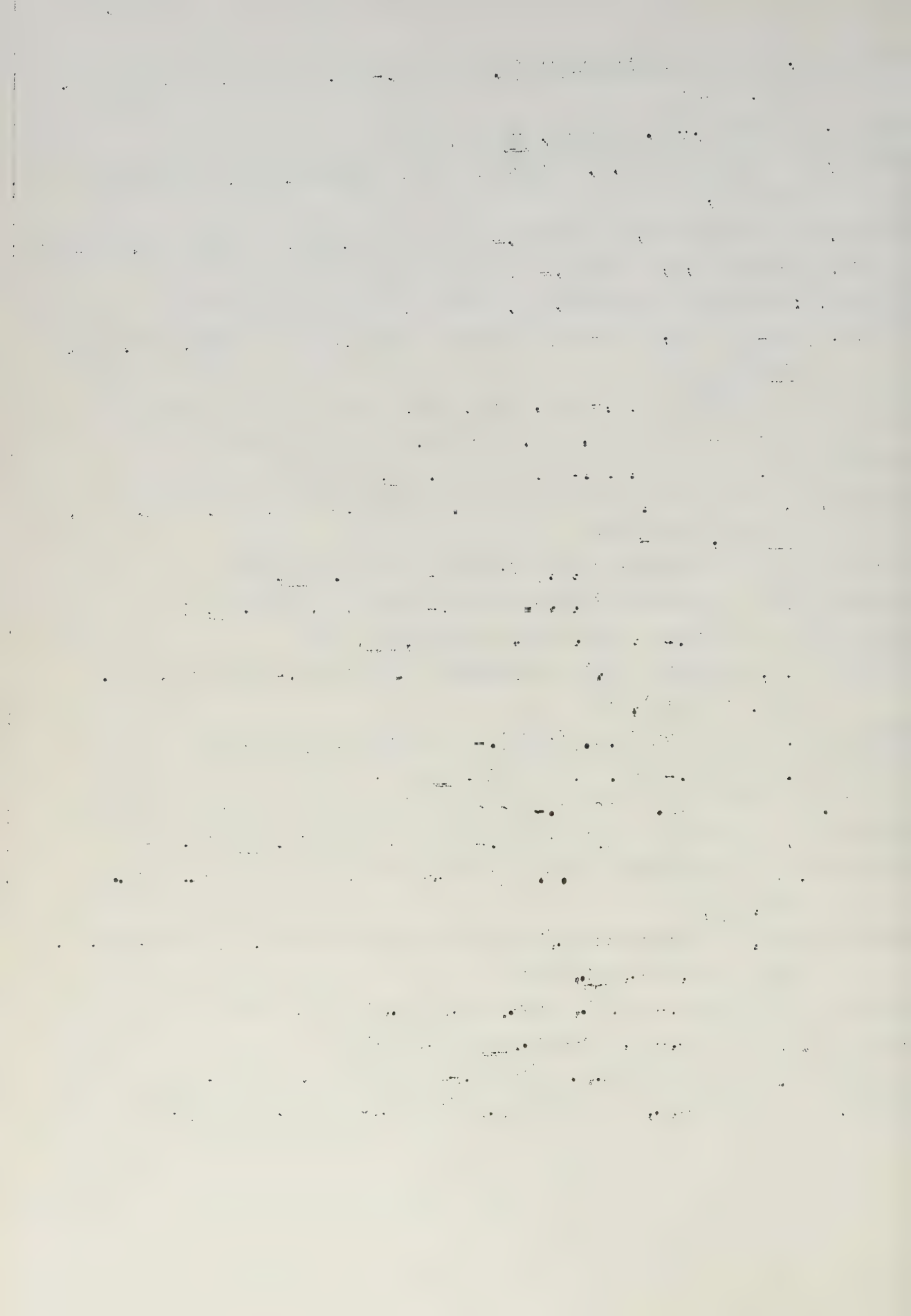
Le cycle évolutif est complet chez le rat, hôte définitif normal, mais incomplet chez le chien. L'augmentation passagère des éosinophiles est visible chez les trois espèces animales. C'est la première fois qu'il nous a été permis d'observer la méningite à éosinophiles chez le chien et chez le chat.

BIBLIOGRAPHIE

- ALICATA (J.E.) (1961).- Hawaii Farm Bureau J. (spec. pub., dec. 1-2
 - (1962).- Canad. J. Zool. 40, 5
- ALICATA (J.E.) et BROWN (R.W.) (1962).- Canad. J. Zool. 40, 755
- ALICATA (J.E.) (1963).- S. Pacific Comm. Tech. Paper 139, gpp.
 - (1963).- J. Parasit. 49, (5 sect. 2), 48
 - (1964).- J. Parasit. 50 (3 sect. 2), 39
- ALICATA (J.E.) et Mc CARTHY (D.D.) (1964).- Canad. J. Zool. 42, 602
- ALICATA (J.E.) (1964).- J. Parasit. 50 (3 sect. 2), 39
 - (1965 a).- Canad. J. Zool. 43, 667
 - (1965 b).- Advances in Parasit. 3, 223. N.Y. and Lond.
 Academic press.
- ALICATA (J.E.) et NISHIMURA (K.). (1965).- J. Parasit. 51 (5), 822
- ALICATA (J.E.) (1969).- J. trop. Med. Hyg., mars 1969, 72, 53
- ALLISON (M.E.) (1962).- Am. J. trop. Med. Hyg. 11, 238-240
- ASH (L.R.) (1962).- J. Parasit. 48, 63-65
 - (1962).- J. Parasit. 48, 66-68
 - (1967).- Noumea South Pacific Commission, working paper
 n° 13, 9 pp.
 - (1968).- J. Parasit. 54 (3), 432-436
- BAILEY (C.A.) (1948).- Naval Medical Research Institute Bethesda Proj.
 NM 005007, Rept. n° 7
- BRUMPT (V.) et coll (1968).- Bull. Soc. Path. Exot. 61 (3), 444-462
- BRYGOO (E.R.) et CHABAUD (A.G.) (1964).- Annales Parasit. hum. et comp.
39, 793
- CHANG (P.K.), CROSS (J.H.), CHEN (S.S.S.) (1968).- J. Parasit. 54 (1), 182
- CHEN (H.T.) (1935).- Ann. Parasit. Hum. comp. 13, 312
- CHENG (T.C.) et BURTON (R.W.) (1965).- J. Parasit. 51 (2), 296
- CHENG (T.C.) (1966).- J. Invert. Path 8 (1), 52-58

- COURDURIER (J.), GUILLON (J.C.), MALARDE (L.), LAIGRET (J.), DESMOULIS (G.)
et SCHOLLHAMMER (1964).- Bull. Path. Exot. 57 (5), 1255
- COURDURIER (J.), DELGADO (Y.), GARNICA (R.), LOPEZ FERNANDEZ (J.R.) et
GUILLON (J.C.) (1966.- Bull. Soc. Path. Exot. 59 (3), 359
- COURDURIER (J.), GUILLON (J.C.) et MALARDE (L.) (1967).- Bull. Soc. Path.
Exot. 60 (2), 165
- COURDURIER (J.), GUILLON (J.C.) et MALLARDE (L.) (1968).- Bull. Soc. Path.
Exot. 61 (2), 254-258
- CROOK (J.R.), FULTON (S.E.) et SUPANWONG (K.) (1968).- Ann. Trop. Med.
Parasit. 62 (1), 27
- CROSS (J.H.) (1967).- South ^Pacific Commussion working paper n° 5, 7 pp.
- DOUGHERTY (E.C.) (1949).- Parasitology 39, 222
- FLOCH (H.A.), COURDURIER (J.) et JACOBI (J.C.) (1966).- Arch. Inst. Pasteur
Guyane française 512, 5 pp.
- FLOCH (H.A.), COURDURIER (J.) et JACOBI (J.C.) (1966).- Bull. Soc. Path.
Exot. 59 (3), 365
- GERICHTER (C.B.) (1949).- Parasitology 39, 251
- GUILHON (J.) (1965).- C.R. Acad. ~~Sc~~ ^Paris 261, 1089
- HARINASUTA (C.P.), SERASUBUN (P.) et RADOMYOS (P.) (1965).- J. Med. Assoc.
Thailand 48, 158
- HEYNEMAN (D.) et LIM (B.L.) (1967).- Med. J. Malaya 21 (4), 377
- HEYNEMAN (D.) et LIM (B.L.) (1967).- Science, 158 (3804), 1057-1058
- HORIO (S.R.) et ALICATA (J.E.) (1961).- Hawaii Med. J. 21, 139
- HUANG (W.H.), CHANG (K.H.) et CHANG (I.H.) (1964).- J. Formosan Med. A.
63, 598
- JACKSON (W.B.) (1962).- In Pacific Rat Ecology, B.P. Bishop Museum,
Honolulu Hawaii Bull. 225, 190-199
- JINDRAK (K.) et ALICATA (J.E.) (1965).- Ann. Trop. Med. parasit. 59, 294
- JINDRAK (K.) et ALICATA (J.E.) (1968).- J. comp. Path. 78, 371-382
- JINDRAK (K.) (1968).- Ann. Trop. Med. Parasit. 62 (4), 506
- KAMENSKY (S.) (1905).- Sborn. Trood. Charkod. Veterinar Institut. The
systematic position of the genera Metastrongylus and Protopstrongylus
among the Strongylidae.
- KETSUWAN (P.) et PRADATSUNDARASAR (A.) (1965).- J. Med. A. Thailand 48,
799-805

- KETSUWAN (P.) et PRADATSUNDARASAR (A.) (1965).- Am. J. trop. Med. and Hyg.
15, 50-51
- KNAPP (S.E.) (1966).- J. parasit. 52 (3), 502
- KNAPP (S.E.) et ALICATA (J.E.) (1967).- Proc. Helminth. Soc. Washington
34 (1), 1
- KUNTZ (R.E.) et MYERS (B.J.) (1964).- Am. J. trop. Med. and Hyg. 13, 686-692
- KWO (M.E.) et KWO (H.I.) (1968).- J. Parasit. 54 (3), 537
- LIAT (L.B.), KONG OYO et LIE (K.J.).- Med. J. Malaya 17 (2), 89
- LIM (B.L.), OW-YANG (C.K.) et LIE KIAN JOE (1965).- Am. J. trop. Med. Hyg.
14 (4), 610
- LIM (B.L.) et HEYNEMAN (D.).- Ann. Trop. Med. Parasit. 59 (4), 425
- LIM (B.L.) (1967).- Ann. trop. Med. Parasit. 61 (4), 429-431
- LINDQUIST (W.D.) et LI (S.Y.).- J. Parasit. 41, 194-197
- LOISON (G.), CAVALLO (A.) et VERVERT (G.) (1962).- Bull. Soc. Path. Exot.
55 (6), 1108-1122
- MACKERRAS (M.J.) et SANDARS (D.F.) (1954).- Nature, 173, 956
- MACKERRAS (M.J.) et SANDARS (D.F.) (1955).- Austr. J. Zool. 3, 1
- MATSUMOTO (T.) (1937).- J. Med. Ass. Formosa, 36, 2620
- NISHIMURA (K.), KAWASHIMA (K.) et MIYAZAKI (T.) (1964).- Kyushu J. Med.
Sci. 15 (5/6), 165
- NISHIMURA (K.) et YOGORE (M.G.) (1965).- J. Parasit. 51 (6), 928
- NISHIMURA (K.) (1966).- Jap. J. Parasit. 15 (3), 232
- OHMURA (S.) et LIN (P.H.) (1945).- Yokogawa (Japanese) Taiwan n°1 Kai 589
- OHBAYASHI (H.) et ORIHARA (H.) (1968).- Jap. J. Parasit. 17 (1), 1-4
- PARMETER (S.N.) et CHOWDHURY (A.B.) (1966).- Bull. Calcutta Sch. trop.
Med. 41; 38
- PROMMINDAROJ (K.), LEEILAWONGS (N.) et PRADATSUNDARASAR (A.) (1962).- Am. J.
trop. Med. Hyg. 11, 759
- PUNYAGUPTA (S.) (1965).- Am. J. trop. Med. Hyg. 15 (3), 370-374
- RICHARDS (C.S.) (1963).- J. Parasit. 49 (5), 46-47
- RICHARDS (C.S.) et MERRITT (J.W.) (1967).- J. Parasit. 53 (2), 382
- ROSEN (L.), LAIGRET (J.), et BORIES (S.) (1961).- Am. J. Hyg. 74, 26



- ROSEN (L.), CHAPPELL (R.), LAQUEUR (G.L.), WALLACE (G.D.) et WEINSTEIN (P.P.)
(1962).- J. Am. Med. Ass. 179; 620
- ROSEN (L.), LOISON (G.), LAIGRET (J.) et WALLACE (G.D.) (1967).- Am. J.
Epid. 85 (1), 17-44
- ROSEN (L.) (1967).- Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 5-16 juin . South Pacific
Commission working paper n° 25, 3 pp.
- ROSEN (L.), ASH (L.R.) et WALLACE (G.D.) (1970).- Am. J. Vet. Res. 31 (1),
131-143
- THACHER (J.E.) et CHEE-HOCK (C.) (1960).- Inst. Med. Res. Federation of
Malaya n° 29, 209-216
- ROSEN (A.G.), CAMPOS (P.C.) et APOSTOL (R.) (1951).- Acta Med. Philippina,
8, 95-107
- DE VIT (A.M.) (1962).- Over Eosinophilie bij Worminfecties en Eosinofiele
Meningitis, Thesis (Amsterdam Univ. 1-125)
- CHONGCHAL (P.S.), NYE (S.W.), BEAVER (P.C.) (1967).- Am. J. trop. Med. Hyg.
16, 454
- ROBERT (E.) (1952).- Bull. Ass. Med. Nouvelle-Calédonie, 4 (1), 23
- WALLACE (G.D.) et ROSEN (L.) (1965).- Am. J. Epidem. 81, 52-62
- " (1966).- Am. J. Epidem., 84 (1), 120
- " (1967).- Am. J. Epidem. 85 (3), 395
- WEINSTEIN (P.P.), ROSEN (L.), LAQUEUR (G.L.) et SAWYER (T.K.) (1963).- Am. J.
trop. Med. and Hyg. 12 (3), 358
- ROD (D.E.) (1965).- J. Parasit. 51 (6), 941
- ONAGOSAWA (T.) (1967).- Jap. J. Parasit. 16 (5), 324
- OKOGAWA (S.) (1937).- Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 27, 1620

DEUXIEME PARTIE

ETUDE IMMUNOLOGIQUE

Dans cette deuxième partie de notre travail nous avons étudié les réactions immunologiques du Rat durant son infestation par Angiostrongylus onensis.

Nous avons suivi le protocole ci-après :

Préparation d'extraits bruts antigéniques à partir des stades adultes du parasite.

Délipidation de l'extrait brut.

Caractéristiques des antigènes

1) caractères chimiques

dosage des protéines

dosage des glucides

dosage des chlorures

électrophorèse

2) Caractères immunologiques

a) réaction d'agglutination

1° - test au latex

2° - hémagglutination

b) réaction de précipitation

1° - diffusion double en gélose

2° - immunoélectrophorèse

c) réaction allergique

d) immunofluorescence

e) réaction de fixation du complément.

I - PREPARATION D'EXTRAITS ANTIGENIQUES

Les quelques travaux consacrés à l'étude antigénique d'Angiostrongylus cantonensis sont ceux d'ALICATA et coll, publiés en 1962, qui préparent l'extrait en solution de coca modifiée à partir d'adultes lyophilisés ; ANDERSON et coll, en 1962, qui étudient les antigènes somatiques et métaboliques extraits d'A. cantonensis ; de KAGAN et coll, en 1964, qui ont fait une extraction saline sur 100 mg d'adultes et de JACOBS et coll, en 1965.

Pour notre travail nous avons repris une méthode d'extraction utilisée à l'Institut Pasteur de Paris et dont les principes sont les suivants :

- 1°) Récolte des vers vivants ;
- 2°) Délipidation préalable à basse température ;
- 3°) Extraction en tampon salin à température inférieure à 4° C.

Ces opérations de base permettent d'obtenir des extraits antigéniques libres des fractions lipidiques responsables de la majorité des réactions allergiques mais conservant intactes les fractions protéiniques pouvant exercer un pouvoir antigénique.

MATERIEL et METHODE

RECOLTE DES VERS VIVANTS

Les adultes immatures (27 jours) d'A. cantonensis sont prélevés lors de l'autopsie de rats blancs parasités expérimentalement au laboratoire par des larves L_3 de ce Nématode. Les rats sont infestés d'une façon massive de 150 à 400 larves L_3 chacun. A ce taux d'infestation les rats commencent à mourir généralement vers le 27ème jour après l'ingestion. Toutefois, dans certains cas, ils sont morts beaucoup plus tôt, les 10ème, 13ème et 18ème jours. Par conséquent nous préférons courir le risque de perdre quelques sujets au cours de l'expérimentation et obtenir une infestation massive des survivants conduisant à une récolte de parasites importante.

Les vers sont recueillis vivants par une dissection minutieuse des systèmes circulatoire, respiratoire et nerveux. Ils sont immédiatement et soigneusement lavés plusieurs fois à l'eau physiologique froide (à 5 lavages), puis séchés rapidement sur papier filtre et pesés. Chaque récolte est ainsi recueillie en boîte de Pétri et congelée à -20° dans le délai le plus bref afin d'éviter tout risque d'autolyse.

Lorsqu'on désire préparer un extrait antigénique, le contenu de plusieurs boîtes de Pétri est décongelé, réuni dans un mortier préalablement refroidi à $+4^{\circ}$ et broyé par congélations successives.

DELIPIDATION

La pâte ainsi obtenue est alors délipidée à basse température. Différents solvants ont été essayés pour ce faire (éther, acétone, alcool, etc...). Les meilleurs résultats furent obtenus avec une délipidation à l'alcool-éther.

Cette opération s'effectue en deux temps :

homogénéisation
centrifugation

1° - Homogénéisation

Il a été établi que 6,6 g de parasites frais correspondaient à 1 g de matière sèche. A cette quantité on ajoute 10 ml d'alcool absolu et on homogénéise au mixeur électrique à la vitesse de 80 tours/seconde pendant 15 minutes dans un bain glacé + alcool (-20°).

2° - Centrifugation

Le broyat à l'alcool est ensuite centrifugé dans une centrifugeuse à intervalle réfrigérée à -20° , à une vitesse de 1000g pendant 15 minutes.

Le liquide surnageant est décanté, le culot est repris. Cette série d'opérations est exécutée 2 fois à l'alcool absolu, une troisième fois avec un volume égal d'éther anhydre (soit 10 ml).

EXTRACTION DE L'ANTIGENE

Le broyat sec est écrasé afin de chasser la dernière trace d'éther et réduit en poudre fine dans un mortier maintenu dans un bain de glace. L'extraction proprement dite est effectuée dans une solution tampon durant 18 heures sur agitateur magnétique en chambre froide (+4°).

Parmi les divers tampons utilisés par les différents expérimentateurs : tampon T.B.S. (triéthanolamine), Véronal sodique, phosphate salin, etc... nous avons choisi un tampon habituellement employé au laboratoire de Parasitologie de l'Institut Pasteur et qui a déjà donné de bons résultats dans la préparation d'extraits antigéniques d'helminthes. Ce tampon est utilisé à raison de 10 ml pour 1g de poudre sèche délipidée.. Il est préalablement refroidi avant de servir pour l'extraction. Cette solution est un tampon au phosphate salin dont la composition est la suivante :

• tampon phosphate salin : solution mère -

phosphate de soude disodique ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$)	57,79/l
phosphate de potassium monopotassique ($\text{PO}_4\text{K H}_2$)	20,5g/l
chlorure de sodium (Na Cl)	8,8g/l

Quantité de solutions à employer à l'extraction :

$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$	76 ml
$\text{PO}_4\text{K H}_2$	24 ml
Na Cl	100 ml

Par comparaison, la composition d'autres solutions tampon est la suivante :

• Tampon T.B.S.

Solution mère concentrée 10 fois

Na Cl	150 g
$\text{Mg Cl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$ (6,25M solution stock)	1,6 ml
$\text{Ca Cl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1,875 M solution stock)	1,6 ml
Triéthanolamine	56 ml
H Cl N.....	360 ml
Eau distillée	q.s.p..... 2 litres

Dissoudre d'abord Na Cl dans 1400 ml d'eau distillée, ajouter $Mg Cl_2$ et $Ca Cl_2$. Ensuite ajouter le triéthanolamine, puis l'acide chlorhydrique. Compléter ensuite à 2 litres. utiliser une prouvette de 2 litres ou une fiole jaugée.

Pour l'emploi il suffit de diluer 1 volume de solution mère avec 9 parties d'eau distillée. Rajuster le pH à 7,3 ou 7,4 à 20° C.

Nota - Conserver la solution au frigidaire.

. Veronal sodique

Véronal sodique 47,586 g

Eau distillée 3 p

H Cl N/10 0,690 L

pH 8,2 : ajouter Na OH 1U (coloration verte)

8,25 : ajouter eau distillée qsp 4,625 L (coloration
bleue)

Une fois l'extraction terminée (18 heures) on opère une centrifugation à 12.000 tours/minute (17300 g) pendant 30 minutes à 4°. Le liquide surnageant coloré en marron-jaune constitue l'extrait antigénique brut délipidé. Il peut être conservé à 0° C après addition de Merthiolate au 1/5.000 pendant plusieurs mois (au moins 6 mois, ensons-nous).

Le protocole complet de trois extractions est résumé dans le tableau n° IX, ci-après.

Tableau n° IX

Numéro des extractions	Poids des vers humides	Poids de la poudre de vers délipidés	quantité de tampon phosphate salin ajoutée	Durée de l'extraction	Dosages		
					protéi- nes	gluci- des	chloru- res
1ère fois	1,50 g	0,175 g	10 ml	18 h	3,4mg/ml	-	-
2ème fois	3,45 g	0,450 g	10 ml	18 h	4mg/ml	-	-
3ème fois	4,12 g	0,51 g	10 ml	18 h	7mg/ml	1,5mg/ml	5g/lit.

Ces opérations d'extractions peuvent être renouvelées en traitant nouveau le culot résiduel avec les mêmes proportions de tampon et les mêmes temps d'extraction et de centrifugation. Mais le rendement diminue rapidement. Par exemple, dans le tableau nous pouvons remarquer que l'antigène contient 4 et 7 mg/ml de protéines pendant les deuxième et troisième extractions, mais ensuite elles diminuent à 1,8 et à 2,9 mg/ml.

II - CARACTERISTIQUES DES ANTIGENES

CARACTERES CHIMIQUES

Avant d'entreprendre les études immuno-sérologiques, nous avons procédé à différents dosages, car la connaissance de la composition chimique de l'antigène joue un rôle très important comme le montrent les travaux de CAMPBELL (1937), MELCHER (1943), KENT (1957 a), DYMOWSKA et al (1965) et BENEX et COURDURIER (1967).

Nous avons donc étudié les protéines, les glucides, les chlorures présents et effectué l'électrophorèse de l'extrait antigénique. Tous les réactifs utilisés, en général, sont conservés au réfrigérateur à + 4°C.

a) Dosage des Protéines

Les dosages des protéines ont été déterminés par la méthode spectro-colorimétrique de FOLIN et WU.

+ Réactifs utilisés

(a) bicarbonate de soude ($\text{Na}_2 \text{CO}_3$) à 2% (2g pour 100 ml de Na OH à 0,1 N = 4 g/lit ; N = 40 g/lit.

(b) liqueur cuprotartrique

1. 0,5 g de Cu SO_4 , 5 $\text{H}_2 \text{O}$ dans 20 ml E.D.

2. 1 g de tartrate de K dans 20 ml E.D.

Au moment de l'emploi mélanger 2 ml de (1.) et 2 ml de (2.) et compléter à 10 ml avec de l'eau physiologique.

(c) 50 cc de (a) + 1 ml de (b)

(d) réactif au phénol

+ Protocole

Opérer avec une dilution pour rester dans la bonne lecture du photomètre :

liquide dosé à diluer 0,1 ml

réactif (c) 5 ml

Attendre 10 minutes

réactif (d) 0,5 ml

Agiter immédiatement. Attendre 30 minutes

Observer au photomètre à longueur d'onde de 500 m μ . L'indicateur spectro-colorimètre est mis sur 0 en traitant avec une solution témoin (eau physiologique, par exemple).

b) Dosage des glucides

La méthode utilisée pour ce dosage est la spectro-colorimétrie de FOLIN et WU.

+ Réactifs utilisés

(a) réactif à l'acide sulfurique (1 ml E.D. + 8 ml $\text{SO}_4 \text{H}_2$ pur)

(b) eau physiologique à 9 p. 1000

(c) réactif au carbazole : 0,5% de carbazole dans l'alcool absolu

(d) solution standard d'antigène diluée au 1/100

+ Protocole

Dans des tubes à réactions (avec bouchons en plastique adaptés)

verser :

- 9 ml de réactif $\text{SO}_4 \text{H}_2$
- 0,1 ml de solution à doser à la surface
- mélanger et refroidir dans la glace
- ajouter 0,3 ml de carbazole

Agiter, boucher, mettre au bain-marie bouillant pendant 10 minutes et refroidir.

Observer au spectro-colorimètre à longueur d'onde 535 m μ , avec une solution témoin préparée parallèlement aux solutions à doser, dans une cuve en verre d'indice de réfraction connu. L'intensité de la coloration est proportionnelle aux taux de polysaccharides.

c) Dosages des chlorures

Le dosage des chlorures (ions Cl^-) est réalisé selon la méthode de HALES.

+ Réactifs

- solution de nitrate mercurique
- solution étalon de Na Cl à 1 p.1000
- solution de tungstate de Na à 10%
- $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 2/3 N
- Diphenyl carbazone en solution alcoolique à 0,1%
- $\text{NO}_3 \text{H}$ environ N : 75 ml $\text{NO}_3 \text{H}$ pur dans 1000 ml E.D.

+ Protocole

X) Dans une fiole conique de 50 ml, introduire :

- 1 ml de solution à doser (antigène)
- 5 ml d'eau distillée
- 4 gouttes d'indicateur coloré à 0,1%
- acidifier par 2 ou 3 gouttes de $\text{NO}_3 \text{H}$
- titrer par une solution mercurique jusqu'au virage mauve pâle.

Sachant que 1 ml de la solution mercurique correspond à 1 mg de Na Cl, on calcule le taux de Na Cl en g/lit.

X) Titrage de la solution de Na Cl

Dans une fiole introduire :

- 1 ml de solution de Na Cl à 1%
- 5 ml d'eau distillée
- 4 gouttes d'IC
- 2 à 3 gouttes de $\text{NO}_3 \text{ H} = \text{N}$

Titrer par la solution mercurique

X) Titrage de la solution mercurique

- nitrate mercurique 3 g
- $\text{NO}_3 \text{ H}$ pur 3 ml
- eau distillée q.s.p. 1000 ml

Titrer la solution mercurique par rapport à une solution de Na Cl à 0,1% et ajouter par dilution jusqu'à ce que 1 ml corresponde à 1 mg de Na Cl.

d) Electrophorèse d'extrait antigénique

L'analyse électrophorétique de l'antigène a été effectuée par le Service de Biochimie de l'Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Terres Tropicales sur acétate de cellulose en tampon véronal sodique pH 8,6 utilisant une microméthode.

Les différentes fractions des protéines ont été obtenues sur densité-mètre intégrateur APELAB.

Les courbes d'électrophorèse font apparaître quatre bandes protéiques a, b, c, d bien séparées (voir graphique n° 2).

e) Remarques

Les rapports antérieurs sur l'intra-dermo-réaction et le test de fixation du complément utilisant l'extrait d'A. cantonensis sont d'ALICATA et coll (1962), d'ANDERSON et coll (1962) et de KAGAN et coll (1964).

ALICATA et coll. préparent l'antigène à partir des vers adultes, broyés en poudre, et extraits dans l'eau physiologique stérile et ils utilisent sans substance préservatrice pour faire le test d'intra-dermo-réaction, à Tahiti et à Hawaï.

ANDERSON et coll, en 1962, selon une technique déjà utilisée pour la préparation d'antigènes à partir d'Anisakis et de Metastrongylus de porc, préparent des antigènes somatiques et métaboliques d'A. cantonensis et l'utilisent pour la réaction de fixation du complément. Pendant leurs travaux ils ont employé neuf sérums d'hommes suspectés de méningite à eosinophiles. Huit d'entre eux donnaient une réaction positive et le neuvième présentait une réaction faible avec l'antigène métabolique. Simultanément il y eut quelques réactions avec l'antigène somatique.

KAGAN et coll (1964) homogénéisent 100 mg de vers adultes sensibilisés dans 10 ml de la solution coca modifiée (Na H CO_3 : 0,27 g, Ca Cl_2 : 0,5 g, merthiolate : 0,02g dans 100 ml d'eau distillée) et laissent 24 heures à + 4°C. Après centrifugation à 10.000 x G pendant 30 minutes ils effectuent la dilution au 1/10.000 (w/v) avec la solution de coca pour faire une comparaison entre les sérums de malades originaires de Porto-Rico et d'autres, par le test d'intra-dermo-réaction.

JACOBS et coll, en 1965, font le test d'hémagglutination en utilisant l'extract métabolique et somatique d'A. cantonensis et les sérums de rats, de singes et de lapins.

L'étude immunologique de plusieurs maladies parasitaires est courante dans les divers laboratoires, en France, et surtout à l'Institut Pasteur de Paris où les techniques sont bien établies (avec un grand succès depuis plusieurs années - BENEX et coll. 1967).

L'analyse chimique et l'électrophorèse d'extraits d'A. cantonensis ont montré un pourcentage de protéines relativement élevé, de glucides, de chlorures et quatre traits de protéines, respectivement.

Seul, le rapport de KAGAN et coll (1964) donne un pourcentage d'azotes (0,84 mg/ml dans l'antigène d'A. cantonensis et 0,008 mg/ml pour le test d'intra-dermo-réaction.

CARACTERISTIQUES IMMUNOLOGIQUES

a) Réactions d'agglutination

Parmi les nombreux tests sérologiques existants nous en avons essayé quelques uns qui avaient déjà donné de bons résultats pour l'étude d'autres infections parasitaires dues aux Nématodes.

Nous présentons ici nos observations sur les réactions entre l'extrait d'A. cantonensis et le sérum de rats infestés par ce parasite.

1 - Test au latex

Le test au latex est une réaction d'agglutination où l'antigène est absorbé à la surface de particules de latex. Le premier, FISCHMAN, en 1960, en Nouvelle-Zélande, proposa pour le diagnostic de l'Hydatidose un test de floculation au latex basé sur la technique utilisée par SINGER et PLOTZ (1956), et PLOTZ et SINGER (1956) pour le diagnostic du rhumatisme articulaire.

Ce test, sous une forme analogue a été repris et utilisé pour le diagnostic de la Trichinellose par INNELLA et REDNER en 1959 et sous une forme assez proche par PARODI, en 1961.

Puis l'agglutination sur lames, plus pratique, remplaça la technique en tubes. Elle fut utilisée par MURASCHI et coll., en 1962, pour la trichinellose, puis par KAGAN et coll., en 1959, pour le diagnostic de la trichinellose et de l'Hydatidose.

Dans ce travail nous avons choisi la technique décrite par BENEX, en 1964, pour le diagnostic sérologique de la Distomatose. Les suspensions de latex utilisées étaient les préparations commerciales délivrées par les laboratoires DIFCO.

+ Technique

- Placer une goutte de sérum à examiner + une goutte du mélange d'antigène et bacto-latex 0,81 sur une plaque de verre ;
- Mélanger avec un bâtonnet les 2 gouttes. Placer la plaque de verre sur un agitateur type de KLINE pendant 6 minutes.
- Lire les résultats immédiatement ou après 2 à 3 minutes de repos, sur fond noir, à l'aide d'une lampe ;
- Comparer les agglutinations obtenues avec un sérum positif connu et un sérum de rat non infesté.

Titration de l'antigène ;

Un titrage de l'antigène par rapport au lot de latex choisi doit être établi au préalable pour déterminer la concentration optimale de l'antigène à utiliser. Pour cela, on pratique des dilutions en séries de l'antigène-stock et on note la solution donnant une agglutination maximale en présence de latex, avec un sérum connu, positif, et aucune agglutination avec un sérum de rat non infesté. Ces données une fois établies n'ont plus besoin d'être vérifiées tant que l'on utilisera le même antigène avec le même lot de latex.

	volume de latex	volume d'antigène
1	1	1
2	2	1
3	3	1
4	1	2
5	1	3

Selon les préparations antigéniques et le lot de latex nos titrages nous permettront d'utiliser 1 volume d'antigène et 2 ou 3 volumes de latex.

En principe pour la latex-agglutination il ne faut pas que le pourcentage de protéines soit supérieur à 1,5 mg/ml dans l'antigène. En même temps il faut s'assurer que le latex lui-même n'agglutine pas.

Les résultats obtenus avec cette technique sont rapportés dans les tableaux X à XV. Le sérum provenait du sang du cœur des rats qui étaient infestés par 60-90 larves L_3 d'A. cantonensis depuis 11 mois. Le nombre des adultes recueillis à l'autopsie est indiqué dans les tableaux suivants.

Tableau n° X

es as l..	ancien- neté de l'infes tation	Nombre de parasites adultes recueillis dans le coeur et les poumons des rats	Réaction d'agglutination au latex							
			pur	dilutions						
				1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
74 j		27	++	+	+	0	0	0	0	0
75 j		25	++	++	++	+	0	0	0	0
"		72	+++	+++	++	++	+	+	+	0
"		66	++	++	++	+	0	0	0	0
"		32	++	++	++	+	0	0	0	0
"		40	+	+	+	+	0	0	0	0
76 j		75	++++	++++	+++	++	++	+	+	0
"		55	++	++	+	+	+	0	0	0
"		85	+++	+++	++	+	+	0	0	0
5 mois		10	++	0	0	0	0	0	0	0
"		0	0	0	0	0	0	0	0	0
"		19	++	+	+	+	0	0	0	0
"		42	++++	++	++	++	+	0	0	0
"		0	0	0	0	0	0	0	0	0
"		13	+	+	0	0	0	0	0	0
11 mois		53	+++	++	+	0	0	0	0	0
"		30	++	+	+	0	0	0	0	0
"		36	+++	+	+	+	0	0	0	0
"		44	+++	+++	++	+	0	0	0	0
"		29	+	+	0	0	0	0	0	0
"		37	++	++	0	0	0	0	0	0
"		40	+++	+++	++	+	0	0	0	0
"		28	+++	+++	++	+	0	0	0	0
"		24	++++	++++	++++	++++	++	0	0	0
"		29	+++	++	+	0	0	0	0	0

Poids des rats : 160 g

Nombre de larves L₃ administrées : 60 - 90

Tableau N° XI

Dates des pré- lèvements des sérum	ancienneté de l'infesta- tion	Réaction d'agglutination au latex							
		pur	dilutions						
			1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
13-5-69	0								
14-5-69	1j	0	0	0	0	0	0	0	0
15-5-69	2j	0	0	0	0	0	0	0	0
16-5-69	3j	0	0	0	0	0	0	0	0
17-5-69	4j	0	0	0	0	0	0	0	0
18-5-69	5j	+	+	0	0	0	0	0	0
19-5-69	6j	++	(+)	0	0	0	0	0	0
20-5-69	7j	++	+	0	0	0	0	0	0
21-5-69	8j	++	+	0	0	0	0	0	0
22-5-69	9j	+++	++	+	0	0	0	0	0
23-5-69	10j	+++++	+++++	+++	++	+	(+)	0	0
30-5-69	17j	++++	++++	+++	++	++	+	0	0
5-6-69	23j	+++	++	+	0	0	0	0	0
10-6-69	28j	++++	++++	++	+	0	0	0	0
19-6-69	37j	+++	+++	++	+	+	+	0	0
23-6-69	41j	++	+	0	0	0	0	0	0
18-7-69	66j	++	+	0	0	0	0	0	0

Poids des rats : 130 g

Infestés le 13-5-69 par 100 larves L₃ d'A. cantonensis

Tableau n° XII

Dates des prélève- ments de sérum	ancienneté de l'infes- tation	Réaction d'agglutination au latex							
		pur	dilutions						
			1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
13-5-69	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14-5-69	1j	0	0	0	0	0	0	0	0
15-5-69	2j	0	0	0	0	0	0	0	0
16-5-69	3j	0	0	0	0	0	0	0	0
17-5-69	4j	0	0	0	0	0	0	0	0
18-5-69	5j	+	0	0	0	0	0	0	0
19-5-69	6j	0	0	0	0	0	0	0	0
20-5-69	7j	(+)	0	0	0	0	0	0	0
21-5-69	8j	++	0	0	0	0	0	0	0
22-5-69	9j	+++	++	0	0	0	0	0	0
23-5-69	10j	+++++	+++++	+++++	+++	++	+	0	0
30-5-69	17j	+++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	0
5-6-69	23j	+++	+++	+++	++	+	+	0	0
10-6-69	28j	++++	++++	+++	++	+	+	0	0
19-6-69	37j	+++	+++	++	+	+	+	0	0
23-6-69	41j	++	+	0	0	0	0	0	0
18-7-69	66j	++	++	+	0	0	0	0	0

Poids des rats : 130 g

Infestés le 13-5-69 par 150 larves L_3 d'A. cantonensis

Tableau n° XIII

Dates des prélève- ments de sérum	ancienneté de l'infestation	Réaction d'agglutination au latex							
		pur	dilutions						
			1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
13-5-69	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14-5-69	1j	0	0	0	0	0	0	0	0
15-5-69	2j	0	0	0	0	0	0	0	0
1 ⁶ -5-69	3j	0	0	0	0	0	0	0	0
17-5-69	4j	0	0	0	0	0	0	0	0
18-5-69	5j	0	0	0	0	0	0	0	0
19-5-69	6j	++++	++++	0	0	0	0	0	0
20-5-69	7j	++++	+++	+	0	0	0	0	0
21-5-69	8j	++++	++	++	0	0	0	0	0
22-5-69	9j	+++	++	+	0	0	0	0	0
23-5-69	10j	++++++	+++++	(+)	0	0	0	0	0

Poids des rats : 130 g

Infestés le 13-5-69 par 200 larves L₃ d'A. cantonensis

Tableau n° XIV

Dates des prélève- ments des sérum	ancienneté de l'infes- tation	Réaction d'agglutination au latex							
		pur	dilutions						
			1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
13-669	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14-6-69	1j	0	0	0	0	0	0	0	0
15-6-69	2j	0	0	0	0	0	0	0	0
16-5-69	3j	0	0	0	0	0	0	0	0
17-5-69	4j	0	0	0	0	0	0	0	0
18-5-69	5j	0	0	0	0	0	0	0	0
19-5-69	6j	++++	+++	0	0	0	0	0	0
20-5-69	7j	++++	++	(+)	0	0	0	0	0
21-5-69	8j	+++	+++	0	0	0	0	0	0
22-5-69	9j	++++	++++	(+)	0	0	0	0	0
23-5-69	10j	++++ +++	++++ ++	++++	(+)	(+)	0	0	0
30-5-69	17j	++++	++++	++++	+++	+	+	0	0
5-6-69	23j	+++	++	+	0	0	0	0	0
10-5-69	28j	++++	++++	++++	++	0	0	0	0
19-6-69	37j	++++	+++	+++	++	+	+	0	0

Poids des rats : 130 g

Infestés le 13-5-69 par 250 larves L_3 d'A. cantonensis

Tableau n° XV

Dates des prélève- ments de sérums	ancienneté de l'infesta- tion	Réaction d'agglutination au latex							
		pur	dilutions						/128
			1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
13-5-69	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14-5-69	1j	0	0	0	0	0	0	0	0
15-5-69	2j	0	0	0	0	0	0	0	0
16-5-69	3j	0	0	0	0	0	0	0	0
17-5-69	4j	0	0	0	0	0	0	0	0
18-5-69	5j	(+)	0	0	0	0	0	0	0
19-5-69	6j	+++	+	0	0	0	0	0	0
20-5-69	7j	++++	+++	0	0	0	0	0	0
21-5-69	8j	++++	+++	(+)	0	0	0	0	0
22-5-69	9j	+++++	++++	++	0	0	0	0	0
23-5-69	10j	++++++	+++++	++++	+	(+)	0	0	0
30-5-69	17j	+++++	++++	++	0	0	0	0	0
5-6-69	23j	++	+	0	0	0	0	0	0
10-6-69	28j	++++	++++	+					

Poids des rats : 400 g

Infestés le 13-5-69 par 400 larves L₃ d'A. cantonensis

2 - Hemagglutination

La technique utilisée était celle faisant appel à la benzidine azotée utilisée pour le diagnostic de l'Hydatidose. Elle s'est révélée utilisable dans ces conditions pour le diagnostic de l'infestation à A. cantonensis.

+ Remarque - Discussion des résultats

Par la technique d'agglutination au latex nous trouvons l'augmentation des anticorps progressivement jusqu'au 10ème jour. A ce moment les sérums de rats infestés par 100, 150, 200, 250 et 400 larves L_3 , dilués au 1/32^e se trouvent positifs (tableaux 3, 4, 5, 6 et 7). Durant ce temps les larves font leur dernière mue (4ème mue) et sont en train de se placer à la surface du cerveau. Seul le sérum du rat infesté par 150 larves L_3 et dilué au 1/64^e se trouve positif au 10^e jour (tableau n° 4).

Le 17ème jour après l'infestation les anticorps sont encore fortement positifs au 1/64^e (tableau n° 4), diminuent, mais restent positifs jusqu'au 76^e jour, à la dilution de 1/64^e et pendant 11 mois à la dilution 1/8^e et 1/16^e pour un cas (tableau n° 2).

Ces expériences ne nous montrent pas une grande différence entre le nombre de larves administrées (minimum 90 larves L_3 et maximum 400) pour la production plus hâtive des anticorps mais il est évident dans les cas chroniques que la concentration des anticorps dépend du nombre des vers vivants dans les poumons et dans le coeur (tableau n°2). Le sérum des rats qui ne possédaient aucun parasite vivant après 5 mois d'infestation donne des réactions négatives (tableau n°2, sérums n° 11 et 14).

JACOBS et coll (1965) avaient réussi à faire la réaction d'hémagglutination avec les globules rouges de mouton tannés et l'extrait métabolique somatique d'A. cantonensis. Ils ont trouvé la possibilité de détecter les anticorps dans le sérum de rat, de singe et de lapin infestés par ce parasite.

Nous pensons que la réaction d'agglutination au latex pourra être utile pour le diagnostic de l'Angiostrongylose due à A. cantonensis. L'étude de la réaction d'hémagglutination serait intéressante à poursuivre ultérieurement.

Bibliographie

- ICATA (J.E.) et BROWN (R.W.) (1962).- Preliminary observations on the use of an intradermal test for the diagnosis of eosinophilic meningoencephalitis in man caused by Angiostrongylus cantonensis. *Canad. J. Zool.* 40 (1), 119
- DERSON (R.I.), SADUN (E.H.), ROSEN (L.), WEINSTEIN (P.P.) et SAWYER (T.) (1962).- The detection of antibodies in eosinophilic meningitis. *J. Parasit.* 48 (2 sect. 2), 15
- EX (J.), CORVAZIER (R.), COURDURIER (J.) et LAMY (L.) (1967).- Les antigènes parasitaires. Préparation et utilisation. IMMEX, mai 1967, 531 p.
- EX (J.) (1964).- Le diagnostic sérologique pratique de la distomatose. *Bull. Soc. Path. Exot.* mai-juillet, 57 (3), 495
- PBELL (D.H.) (1937).- The immunological specificity of a polysaccharide fraction from some common parasitic helminths. *J. Parasit.* 23 (4), 248
- OWSKA (Z.), ZAKRZEWSKA (A.) et ALEKSANDROWICZ (J.) (1965).- Antigens of Trichinella spiralis. *Acta Parasit. Pol.* 13 (14/23), 183
- CHMAN (A.) (1960).- Flocculation test in Hydatid disease. *Journ. of clinical Pathology* 13, 72
- CHMAN (A.) (1960).- A rapid latex test for Hydatid disease. *N. Zealand Med. J.* 13, 485
- ELLA (F.) et REDNER (W.J.) (1959).- Latex-agglutination serology test for trichinosis. *J.A.M.A* 171, 885
- OBBS (L.), LUNDE (M.N.) et WEINSTEIN (P.P.) (1965).- Hemagglutination test results with antigen derived from cultures of Angiostrongylus cantonensis and with whole worm extracts. *J. Parasit.* 2 (2 sect. 2), 38
- AN (I.G.), ALLAIN (D.S.) et NORMAN (L.) (1959).- An evaluation of the hemagglutination and flocculation tests in the diagnosis of Echinococcus disease. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 8, 51
- AN (I.G.) et ZAIMAN (H.) (1964).- Evolution of Helminth skin-test of antigens in a hospital in New-York City. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 13 (1), 82-88

- ENT (H.N.) (1957 a).-- Biochemical studies on the proteins of H. diminuta.
Experimental Parasitology 6, 351
- ENT (H.N.) (1960).-- Isolation of specific antigens from Ascaris lumbricoides (var. suum). Experimental Parasitology, New York 10 (3), 313-323
- ELCHER (L.R.) (1943)... An antigenic analysis of Trichinella spiralis.
J. infect. Dis. 73 (1), 31
- FRASCHI (I.F.), BLOOMFIELD (N.) et NEWMAN (R.B.) (1962).-- A slide latex-particle agglutination test for trichinosis. Am. J. Clin. Path. 37, 227
- RODI (E.) (1961).-- Sull' impiego del test di fiocculazione al "latex" per la diagnosi di Echinococcosi. Gior. di igiene e ord. prevent, 2, 200
- LOTZ (C.M.) et SINGER (J.M.) (1956).-- The latex fixation test. II. Results in rheumatoid arthritis. Am. J. Med. 21, 893
- Recueil des Techniques du Service de Biochimie de l'Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux.
- SINGER (J.M.) et PLOTZ (C.M.) (1956).-- The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. Am. J. Med. 21, 888

b) Réaction de précipitation (double diffusion en gélose)

La réaction d'immunoprécipitation a été signalée pour la première fois par Rudolf KRAUS, en 1897, à Vienne, et BECHHOLD en 1905, en Allemagne (cité par WEIR 1967).

LOUDIN, en 1946, en France, rapporte la technique de diffusion en tube, puis la méthode de la diffusion double a été établie par SCHUTTERLONY, en 1947, en Suisse, ELEK 1948 et OAKLEY et coll, 1953, en Angleterre.

Depuis cette époque des changements et des améliorations de cette technique ont permis de la modifier, comme la technique d'immunoélectrophorèse. POULK, en 1952, a essayé de faire l'immunoélectrophorèse sur papier. GRABAR et coll., en 1953 et 1960, au milieu de la gélose comme l'immunodiffusion en gélose.

En ce qui concerne l'étude de l'immunoprécipitation pour les helminthes parasites, nous rappellerons les premiers travaux de SOULSBY, en 1957, et de KAGAN, en 1957, sur Ascaris (cité par WEIR 1967). Plus tard, HUNTER et coll (1961), BIGUET et coll (1962) et CAPRON et coll (1964) ont travaillé sur l'immuno-précipitation avec des sérums d'animaux parasités par la Trichine, par Schistosoma mansoni et Fasciola hepatica.

Nous avons essayé d'utiliser ce test de précipitation avec l'antigène d'A. cantonensis et le sérum de rats infestés par le même parasite. Nous décrivons très brièvement la technique et les résultats obtenus par :

1. l'immunodiffusion en gélose

2. l'immunoélectrophorèse

1. Etude des traits de précipitation obtenue en gélose
.....

Lorsque la réaction de précipitation spécifique est effectuée en milieu gélifié, le précipité apparaît sous forme d'une zone opaque qui peut occuper une place fixe ou se déplacer en fonction du temps. La précipitation spécifique en milieu gélifié permet de dénombrer et d'identifier les divers couples antigènes-anticorps individuels présents dans un ensemble hétérogène.

- on laisse la gélose se solidifier ;
- la deuxième solution gélosée d'immun-sérum (1 vol. de gélose + 0,5 vol. de sérum de malade) a été introduite.
- laisser refroidir.

La cuve en plastique soigneusement bouchée avec de la paraffine est déposée dans un endroit du laboratoire aussi soustrait que possible aux variations de température.

On observe l'apparition et l'évolution des précipitations dans les heures et les jours suivants.

Diffusion en plaque - Technique d'OUCHTERLONY (en boîtes)

+ Principe

On opère dans des plaques de gélose dans lesquelles sont aménagées des cavités où l'on dépose soit la solution antigénique, soit l'immun-sérum. La précipitation se produit sous forme de stries dans le gel qui sépare les 2 cavités. Si le système étudié est multiple on observe plusieurs stries qui correspondent aux divers couples antigènes-anticorps. En ménageant plus de 2 cavités dans la même plaque de gel, on peut comparer directement plusieurs immun-sérums avec la même solution antigénique ou inversement plusieurs préparations antigéniques avec le même immun-sérum.

+ Préparation des plaques de gélose

Une plaque de 5 mm environ d'épaisseur a été préparée en versant dans la partie intérieure d'une boîte de Pétri de 8 cm de Diamètre, 20 ml de gélose fondue à 1,5%.

+ Exécution de la réaction

Les réactifs désirés (l'antigène et le sérum normal et le sérum de malade) ont été mis dans les cavités. Les boîtes sont déposées à 37° C dans une atmosphère humide et sont observées tous les jours, pendant une semaine.

Pour l'expérience, l'immunodiffusion en gélose a été réalisée avec l'extrait d'A. cantonensis et les sérums de rats infestés par le même parasite, depuis 11 mois, L'antigène contenait 3,4 mg/ml de protéines. Nous voyons un trait épais et l'autre mince dans la boîte de Pétri et dans la cuve qui apparaissent après 24 heures d'incubation dans l'étuve à 37° (Photos 12 et 13).

Après cette expérience, plusieurs rats étaient infestés et leur sérum prélevé à des intervalles réguliers à partir du premier jour d'infestation pour la diffusion en gélose.

Nous avons procédé comme suit :

- le sérum pur et dilué est placé à différents endroits
- l'antigène pur et dilué est toujours placé au milieu de la boîte de Pétri et au bas de la cuve.

Un lot de rats a été réinfesté par 400 larves au stade L_3 , de nombreux mois après la première infestation. Leur sérum ne donne aucun trait de précipitation jusqu'au 10ème jour et les rats commencèrent à mourir à partir du 11ème jour.

Les traits de réaction sont bien visibles à partir de 24 heures normalement dans les boîtes de Pétri et les cuves (cf. planche 1)

2. Immuno-électrophorèse

Avec ce test nous avons obtenu quelques résultats de réaction entre l'extrait d'A. cantonensis (4 mg/ml de protéine) et de sérum de rats infestés par le même parasite. La technique employée a été celle utilisée par le laboratoire d'immuno-parasitologie de l'Institut Pasteur de Paris, pour cette analyse.

Le prélèvement de sérum a été fait à intervalles réguliers : 5, 10, 15 jours après l'infestation.

L'électrophorèse dure 3 heures à 70 volts et 40 mA par plaque.

Résultats :

Les résultats obtenus sont indiqués dans la Planche 2. Sur les lames n° 1 et 2 nous ne voyons aucun trait avec les sérums du rat non-infesté et l'antigène d'A. cantonensis placé au milieu. Sur 4 autres plaques (lames 3, 4, 5 et 6) contiennent les sérums de malade respectivement

aux 6ème, 15ème, 3⁰ème et 40 ème jours d'infestations) révèlent une réaction positive.

Entre les sérums des malades et l'antigène nous voyons deux traits de précipitation.

Remarques

Dans la diffusion en gélose les traits de précipitation apparaissent à partir de 24 heures d'incubation à 37° C avec l'antigène pur ou dilué.

Nous avons utilisé conjointement des sérums soit purs, soit dilués, mais il n'apparaît jamais plus que deux traits de précipitation. Il en va de même avec un sérum de malade chronique depuis 11 mois.

L'immuno-électrophorèse révèle aussi des arcs très fins à partir du 6ème jour et plus épais après 1⁰ et 17 jours d'infestation des rats.

Nous avons pu observer que dans le cas de l'Angiostrongylose du rat la réaction d'immunoprécipitation semble capable de provoquer deux traits de précipitation tandis que la larve de Trichinella a 11 traits (TANNER et coll. 1961), S. mansoni a 14 traits (BIGUET et coll. 1962) et F. hepatica a 7 traits (CAPRON et coll 1964) de précipitation.

Bibliographie

- BECHHOLD (H.) (1905).- Strukturbildung in Galletten. Z. phys. Chem. 52, 185
- BIGUET (J.), CAPRON (A.) et TRAN VAN KY (P.) (1962).- Les antigènes de Schistosoma mansoni. I. Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique. Caractérisation des antigènes spécifiques. Ann. Inst. Pasteur 103, 763
- CAPRON (A.), BIGUET (J.), TRAN VAN KY (P.) et ROSE (G.) (1964).- Possibilités nouvelles dans la distomatose humaine à Fasciola hepatica. Mise en évidence d'anticorps sériques par immuno-électrophorèse. La Presse Médicale 72, 3103

- ELEK (S.D.) (1948).- The recognition of toxogenic bacterial strains in vitro
Brit. Med. J., I, 483
- GRABAR (P.) et WILLIAMS (C.A.) (1953).- Méthode permettant l'étude conjuguée d
des propriétés électrophorétique et immunologiques d'un mélange
deprotéines. Application au sérum sanguin. Biochim. biophys. Acta
10, 193
- GRABAR (P.) et BURTIN (P.) (1960).- Analyse immunoélectrophorétique. MASSON
et Cie, Editeurs, 120, Bd St-Germain, Paris (11°)
- KALON (I.G.) (1957).- Serum-agar diffusion studies with Ascaris antigens.
J. infect. Dis. 101, 11
- DAKLEY (C.L.) et FULTHORPE (A.J.) (1953).- Antigenic analysis by diffusion.
J. Path. Bact. 65, 49
- OUCTHERLONY (O.) (1948).- In vitro method for testing the toxic-producing
capacity of diphtheria bacteria. 8th scandinavian Pathological
Congres 1947. Acta path. microbiol. scand. 25, 186
- LOUDIN (J.) (1946).- Méthode d'analyse immunologique par précipitation
spécifique en milieu gélifié. C.R. Acad. Sc. 222, 115
- LOUDIN (J.) (1952).- Specific precipitin in gels and its application to
immunological analysis. In "Methods in Medical Research" vol. V,
pp. 335-378. Corcoran A.C. Chicago III : year book Publishers inc.
- POULIK (M.D.) (1952).- Filter paper electrophoresis of purified diphtheria
toxoid. Canad. J. Med. Sci. 30, 417
- SOULSBY (E.J.L.) (1957).- Antigenic analysis of Ascaris tissues by the
double diffusion precipitin test. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.
51, 29
- TANNER (C.E.) et GREGORY (Hudith) (1961).- Immunochemical studies of
antigens of Trichinella spiralis. I. Identification and enumeration
of antigens. Canad. J. Microbiol. 7, 473
- WITEB (D.M.) (1967).- Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific
Publications Oxford. Edinburgh, pp. 1245

c) Réaction allergique

C'est STEFANOPOULO et coll qui les premiers, en 1940, l'utilisèrent pour leurs travaux sur la filariose humaine à Dracunculus medinensis. Depuis de nombreuses publications existent sur ce sujet relatives aux maladies parasitaires de l'homme et des animaux. Nous retiendrons celles d'ALICATA et coll (1962) et de KAGAN et coll (1964) qui utilisent le test d'intra-dermoréaction dans l'angiostrongylose de l'Homme due à Angiostrongylus cantonensis.

Durant notre expérimentation nous l'avons essayé sur les rats et les chiens indemnes ou infestés expérimentalement par A. cantonensis et par A. vasorum.

L'extrait d'A. cantonensis adultes en tampon phosphate 7,2 a été standardisé à la dose de 0,028 mg de protéines par 0,1 ml et a été conservé au congélateur à -20° C dans de petits flacons. Au moment de l'emploi le contenu d'une ampoule a été injecté à l'aide d'une seringue à tuberculine, dans le derme des animaux infestés expérimentalement par A. cantonensis au laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort. Nous avons également effectué ce test sur des chiens infestés par A. vasorum. Nos observations sont résumées dans les tableaux ci-contre (n° 8 et 9). Quelques cas de réactions très positives ont été photographiés. En tous, nous avons employé 10 chiens infestés par A. cantonensis, 15 chiens infestés par A. vasorum et 3 rats contaminés par A. cantonensis. A 4 cm de distance du point d'inoculation, nous injectons de l'eau physiologique, à la même dose, ce qui nous a permis de faire des comparaisons.

Remarque :

Les chiens infestés par A. cantonensis donnent une réaction très positive à partir du 5ème jour de l'infestation jusqu'au 58ème jour. Les examens des excréments ne révèlent encore aucun parasite. La réaction apparaît environ 40 minutes après l'injection. Elle se traduit par un oedème et un érythème cutané très net. L'injection d'eau physiologique ne provoque aucune réaction visible sauf la présence d'un point rouge correspondant à la piqûre. Les chiens non infestés ne réagissent pas. Les rats infestés ou non restent négatifs.

D'autre part les jeunes chiens infestés par A. vasorum réagissent avec l'extrait d'A. cantonensis tandis que les chiens infestés depuis longtemps ne donnent aucune réaction (n° 26, 27, 28 et 29). Dans les cas positifs, les réactions apparaissent au bout d'une heure et diminuent 3 à 5 heures après. Parmi les 12 jeunes chiens utilisés, un n'a pas réagi, de même que les témoins.

ALICATA et coll (1962) qui se servaient de la réaction d'intra-dermoréaction chez 10 hommes (9 à Tahiti et 1 à Hawaï) pour le diagnostic de la méningite à éosinophiles et sur 5 personnes suspectes mais qui ne présentaient pas de symptômes confirmés, trouvèrent les tests positifs, alors que 5 autres personnes qui résidaient en dehors de la région incriminée n'ont manifesté aucune réaction. Pendant leur expérience le diamètre de la région oedémateuse varie de 8 à 11 mm et le diamètre de l'érythème mesure de 25 à 40 mm. Dans un cas la durée de la réaction fut de 4 heures.

KAGAN et coll (1964) rapportent 16 réactions positives chez un groupe d'hommes de Porto-Rico où l'existence de l'angiostrongylose murine n'a pas été mise en évidence. Les auteurs pensent que la réaction n'est pas spécifique. Le même antigène ne donne pas de réactions positives chez 233 hommes étrangers à Porto-Rico qui habitaient dans une zone non endémique. Dans leur expérimentation la réaction donne une lésion de 1,2 cm de diamètre, plus du double de celle de la réaction du témoin.

Au laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort les chiens présentèrent une réaction de 1,5 à 3 cm, avec érythème. Cette réaction positive dure de 5 heures à 20 heures. D'autre part, avec A. vasorum, la réaction non-spécifique dure de 3 à 5 heures et révèle une dimension de 1 à 2 cm.

Il serait intéressant de continuer les recherches surtout pour des infestations de 60 jours et plus par A. cantonensis de chiens et de rats.

Bibliographie

- ALICATA (J.E.) et BROWN (R.W.) (1962).— Preliminary observations on the use of an intradermal test for the diagnostic of Eosinophilic Meningo-encephalitis in Man caused by A. cantonensis. Canad. Journal of Zoology 40, 119-124
- KAGAN (I.G.) et ZAIMAN (H.) (1964).— Evaluation of ^Helminth skin-test antigens in a hospital in New-York City. Am. J. trop. Med. Hyg. 13 (1), 82-88
- STEFANOPOULO (G.J.) et DANIAUD (J.) (1940).— Réaction de fixation du complément et intradermo-réaction au cours de la filariose humaine à Dracunculus medinensis. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 33 (3), 149-152

N° des animaux	Espèces animales	âge des animaux au moment du prélè- vement	sexes	Poids	Nombre de larves L ₃ adminis- trées	ancienneté de l'infes- tation au moment du prélève- ment	durée de lecture de la réaction	diamètre du cercle de la réaction	Intensité de la réaction Résultats
1	Chien	81 jours	♀	3,000 kg	4.000	5 jours	6 heures	1,5 cm	+
2	Chien	82 jours	♀	3,000 kg	4.000	6 jours	6 heures	1,5 cm	+
3	Chien	83 jours	♀	3,000 kg	2.000	7 jours	10 heures	2,5 cm	+
4	Chien	81 jours	♂	4,300 kg	2.000	10 jours	7 heures	3,0 cm	+
5	Chien	82 jours	♀	4,300 kg	2.000	11 jours	8 heures	2,5 cm	+
6	Chien	82 jours	♀	3,000 kg	8.000	33 jours	20 heures	3,0 cm	+
7	Chien	83 jours	♀	3,000 kg	8.000	34 jours	18 heures	3,0 cm	+
8	Chien	82 jours	♀	3,000 kg	600	50 jours	20 heures	3,0 cm	+
9	Chien	82 jours	♂	3,000 kg	470	57 jours	10 heures	2,5 cm	+
10	Chien	84 jours	♀	3,000 kg	600	58 jours	5 heures	1,0 cm	+
11	Rat	adulte	♀	180 gr	150	49 jours	-	-	négative
12	Rat	adulte	♀	180 gr	150	45 jours	-	-	négative
13	Rat	adulte	♀	180 gr	150	46 jours	-	-	négative

Tableau n° XVI

Animaux infestés par *Angiostrongylus cantonensis*

I. D. R.

N° des animaux	Espèce animale	Âge des animaux au moment du prélè- vement	sexes	Poids	Nombre de larves L ₃ adminis- trées	ancienneté de l'infes- tation au moment du prélève- ment	durée de lecture de la réaction	diamètre du cercle de la réaction	Intensité de la réaction Résultats
14	Chien	85 jours	♀	2,700 kg	400	10 jours	4 heures	2,0 cm	++
15	"	85 jours	♀	2,200 kg	"	10 jours	4 heures	1,5 cm	++
16	"	85 jours	♂	2,000 kg	"	10 jours	4 heures	1,0 cm	+
17	"	85 jours	♂	2,050 kg	"	10 jours	5 heures	2,0 cm	++
18	"	85 jours	♀	2,100 kg	"	10 jours	4 heures	2,0 cm	++
19	"	85 jours	♀	2,100 kg	"	10 jours	4 heures	2,0 cm	++
20	"	82 jours	♂	1,450 kg	"	10 jours	4 heures	2,0 cm	++
21	"	82 jours	♀	2,000 kg	"	10 jours	3 heures	2,0 cm	++
22	"	82 jours	♀	2,200 kg	"	10 jours	3 heures	2,0 cm	++
23	"	82 jours	♂	1,400 kg	"	10 jours	3 heures	2,0 cm	++
24	"	82 jours	♀	2,450 kg	"	10 jours	3 heures	2,0 cm	++
25	"	82 jours	♂	1,500 kg	"	10 jours	3 heures	1,0 cm	+
26	"	adulte	♂	16 kg	"	10 jours	-	-	négative
27	"	4 ans	♀	17 kg	10.000	28 mois	-	-	négative
28	"	22 mois	♀		659	48 jours	-	-	négative
29	"	adulte	♀			16 mois	-	-	négative
			♀			9 ans	-	-	négative

Tableau n° XVII

Animaux infestés par *Angiostrongylus vasorum*

I.D.R.

d) Immunofluorescence

Le test d'immunofluorescence est une technique très moderne et son utilisation en immuno-parasitologie doit conduire à des résultats fructueux. Cette technique consiste à marquer les anticorps par des substances fluorescentes appelées fluorochromes.

MARACK en 1934 signale, pour la première fois, que certains colorants peuvent être couplés à des anticorps sans modifier les propriétés de ces derniers. Puis COONS et coll. utilisent cette technique en 1941 et 1942, avec un colorant fluorochrome : l'isocyanate de fluorescéine et l'appellent "test de microprécipitation visible".

La réaction d'immunofluorescence, technique très sensible et pratique, est basée sur le contact d'anticorps marqués et d'un antigène figuré. Après l'incubation, l'excès du conjugué est éliminé par un lavage et la préparation est examinée en lumière ultra-violette. Dans le cas de réaction spécifique les anticorps se fixent sur l'antigène et forment un complexe fluorescent avec des molécules de fluorochrome auxquelles ils sont couplés. D'autre part s'il n'y a pas de réaction spécifique, les anticorps marqués s'éliminent pendant le lavage et on ne voit pas la fluorescence.

Depuis 1957 cette technique a été employée comme moyen de diagnostic pour plusieurs maladies parasitaires, mais en ce qui concerne les Nématodes nous rappelons les publications de JACKSON et coll (1957) sur la Trichine, JACKSON (1959 et 1960) sur Trichinella spiralis et Nippostrongylus muris, de SADUN et coll (1962) sur la Trichine et de AMBROISE-THOMAS (1969) sur les filarioses et anguilluloses humaines (Strongyloides stercoralis).

Dans notre présent travail nous avons réalisé la réaction d'immunofluorescence entre les anticorps contenus dans les sérums de rats infestés par A. cantonensis et des coupes d'antigène figurée par des larves infestantes dans les tissus des mollusques (Biomphalaria glabrata).

Nous avons utilisé les techniques du Laboratoire d'immuno-parasitologie de l'Institut Pasteur de Paris et le sérum fluorescent de lapin anti-globuline de rats délivré par l'Institut Pasteur de Paris. Le conjugué était dilué au 1/3, 1/5 et 1/10.

Protocole :

La technique est basée sur le marquage des réactifs immunologiques par un colorant fluorescent. Elle demande très peu d'antigène qui révèle les anticorps incomplets (non précipitants, non agglutinants et non fixants).

Les techniques d'application sont surtout

- la méthode directe
- la méthode indirecte

Technique de la méthode d'immunofluorescence indirecte

1. anticorps non marqués (recherchés) sont fixés sur l'antigène ;
2. Mise en évidence de ces anticorps par action d'un sérum marqué anti-globulines anticorps (antigène globulines) spécifique de l'espèce ayant fourni le sérum à examiner.

- Les Mollusques vivants contenant les larves L_3 d'Angiostrongylus cantonensis sont extraits de leur coquille et sont fixés au formol à 10% neutralisé et froid.
- ils sont déshydratés dans 3 bains d'alcools successifs (70°- 90°- 100°) et enfin dans un bain de xylène ;
- ils sont inclus dans la paraffine ;
- ils sont coupés (200 microns) et on contrôle la présence des larves après coloration à l'hémalum dans les coupes ;
- les coupes positives sont séchées à la température ambiante;
- du côté des étalements, on grave au diamant un numéro d'ordre qui permet le repérage des préparations, et un cercle entourant la coupe ;
- les préparations sont fixées et délipidées pendant 10 minutes dans un bain d'acétone, à la température du laboratoire;
- pour chaque sérum considéré, on pratique les dilutions suivantes : 1/10, 1/20, 1/40, etc... dans un tampon à pH 7,2

(Na Cl (chlorure de sodium) 8,5g
 (PO₄ H Na (phosphate de sodium disodique)..... 2,8g
 (PO₄ H Na (phosphate de sodium monosodique)..... 0,3g
 (eau distillée ou eau permutée 1000 ml

- les diverses dilutions des sérums étudiés sont réparties chacune sur un étalement à raison de 2 à 3 gouttes;
 les lames sont placées pendant une demi-heure à l'étuve à 37° C en atmosphère humide ;
- lavage dans deux bains successifs de tampon à 7,2 (5 minutes chaque fois). Au sortir du deuxième bain les lames sont séchées devant un ventilateur, et on essuie rapidement toute la surface extérieure au cercle limitant les coupes ;
- Pour des raisons de simplicité nous utilisons un conjugué du commerce: l'antigammaglobuline de rat fluorescent de l'Institut Pasteur de Paris qui, au moment de l'emploi, est dilué au 1/3, 1/5 et 1/10^e. Le conjugué est réparti à raison de 2 ou 3 gouttes sur chaque coupe et comme précédemment, les préparations sont placées une demi-heure à 37° C en atmosphère humide.
- On procède à des lavages identiques et au séchage comme précédemment;
- On plonge les préparations dans un bain de bleu d'Evans à 1/10.000 pendant 10 minutes. On lave de nouveau et on sèche, puis on recouvre d'une lamelle montée sur une goutte de glycérine tamponnée à pH 7,2 (9 volumes de glycérine + 1 volume de solution tamponnée à pH 7,2) (montage Bacto FA, Laboratoires Difco);
- les préparations sont examinées au microscope en lumière ordinaire ou en lumière ultra-violette.

Résultats

Nos observations sont indiquées dans le tableau n° 20.

Dans la première expérience nous avons commencé par une dilution du conjugué au 1/3, puis au 1/5^e et enfin nous avons trouvé que la réaction est comparativement plus nette avec une dilution du conjugué au 1/10^e. Dans ce cas les sérums purs ou dilués des malades sont fluorescents tandis que les sérums de rats non infestés donnent une couleur

rouge sur la coupe de tissu de mollusque. La présence d'anticorps homologues est observée le 4ème jour mais plus faiblement que les 17, 20 ou 23ème jours. Jusqu'à cette période les sérums dilués au-dessous de 1/40ème ne réagissent pas bien tandis que les sérums de malades chroniques (infestés depuis 11 mois) réagissent nettement dans plusieurs dilutions jusqu'à 1/160ème.

Tableau n° XVIII

ancienneté de l'infes- tation	dilutions du conjugué						
	pur	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
avant	-	-	-	-	-	-	-
1 jour	-	-	-	-	-	-	-
2 jours	-	-	-	-	-	-	-
3 jours	-	-	-	-	-	-	-
4 jours	+	+	-	-	-	-	-
5 jours	+	+	+	-	-	-	-
6 jours	+	+	+	-	-	-	-
7 jours	+	+	+	-	-	-	-
8 jours	+	+	+	-	-	-	-
17 jours	+++	+	+	-	-	-	-
20 jours	+++	+++	+	+	-	-	-
23 jours	+++	++	+	+	-	-	-
11 mois	-	-	+	+	++	+	+
Témoin	-	-	-	-	-	-	-

Remarque :

Le tableau présenté ici indique que cette technique d'immuno-fluorescence pourra s'appliquer pour faire le diagnostic de l'Angiostrongylose à Angiostrongylus cantonensis chez le rat. Cette réaction, sur les coupes de larves d'A. cantonensis est localisée au niveau de la cuticule et de l'espace sous-cuticulaire de ces larves. La réaction est positive dans 100% des cas.

JACKSON et coll (1957) ont fait incuber des larves de Trichinella spiralis avec l'immun-sérum fluorescent et le sérum normal non étiqueté qui, après un lavage, émettent une fluorescence brillante jaune-vert, tandis que les larves incubées avec le sérum fluorescent normal et l'immun-sérum non étiqueté ne donnent pas de fluorescence et il est difficilement visible en lumière ultra-violette, mais visible en lumière ordinaire.

Les auteurs concluent que la formation de précipité dans l'immun-sérum spécifique est un résultat de la réaction entre les anticorps de sérum d'hôte immun et l'antigène sur la surface des larves ou dans leurs sections. SADUN et coll (1962) utilisent des larves de T. spiralis en formol à 10%. Comme ils ont expérimentés 142 sérums humains, ils ont obtenu des résultats quantitatifs et qualitatifs pour cette affection par la technique d'immuno-fluorescence. AMBROISE-THOMAS (1969) trouve environ 88% de cas positifs par cette technique dans l'Anguillulose à Strongyloides stercoralis chez l'homme et l'immuno-fluorescence lui permet de mettre en évidence des anticorps spécifiques dans plus de 92% de cas de filarioses diverses.

Les résultats que nous avons obtenus avec cette technique dans l'Angiostrongylose à A. cantonensis paraissent identiques et intéressants. Ils semblent meilleurs avec les sérums de malades chroniques.

Bibliographie

- AMBROISE-THOMAS (A.P.) (1969).- Etude séro-immunologique de dix parasites par les techniques d'immunofluorescence. Thèse présentée à la Faculté de Médecine de Lyon (France), pp. 644
- COONS (A.H.), CREECH (H.J.) et JONES (R.N.) (1941).- Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47, 200
- COONS (A.H.), CREECH (H.J.), JONES (R.N.) et BERLINER (E.) (1942).- The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. Journal of immunology 45, 159-170
- JACKSON (G.J.) et LEWERT (R.M.) (1957).- Immune precipitates on nematode parasites studied in vitro with fluorescent and unlabelled serum. J. Parasit. 43 (5 sect.2), 43
- JACKSON (G.J.) (1959).- Fluorescent antibody studies of Trichinella spiralis infections. J. infect. Dis. 105, 97
- JACKSON (G.J.) (1960).- Fluorescent antibody studies of Hippostrongylus muris infection. J. infect. Dis. 106, 20
- MARACK (J.) (1934).- Nature of antibodies. Nature 133, 292
- SADUN (E.H.), ANDERSON (R.I.) et WILLIAMS (J.S.) (1962).- Fluorescent antibody test for the serological diagnosis of Trichinosis. Expt. Parasit. 12, 423

e) Réaction de fixation du complément

Cette réaction est une des premières à avoir été utilisée pour le diagnostic de certaines maladies parasitaires dues à des Helminthes (GHEDINI, 1906). La technique dérive des techniques classiques employées dans l'immunologie microbienne. ANDERSON et coll, en 1962, utilisaient cette réaction avec l'antigène somatique et métabolique d'A. cantonensis et 9 sérums de Tahitiens et découvraient des anticorps dans les cas de méningite à éosinophiles.

Pour effectuer nos recherches sur l'immunologie d'A. cantonensis nous avons utilisé une réaction de type KOLMER, légèrement modifiée. Elle est caractérisée par l'emploi d'une faible quantité de globules rouges, de 2 unités de complément et de 2 unités d'hémolysine. La fixation se fait à 37° C pendant une heure. Cette fixation dite "à chaud" a été préférée à la fixation "à froid" pendant une nuit en glacière. En effet, celle-ci s'est révélée moins fidèle et les travaux récents de cinétique immunologique ont permis de vérifier qu'une fixation à 37° C en R.F.C. était meilleure qu'une fixation à + 6°, compte-tenu de l'énergie d'activation nécessaire à la collision antigène-anticorps conduisant à la formation de l'immuno-complexe.

Cette R.F.C. a pour but de déterminer la dilution la plus élevée d'un immun-sérum susceptible de fixer en une heure à 37° C, 2 unités de complément en présence de l'antigène à la dilution optimale.

Les réactifs utilisés sont :

complément de cobaye

sérum hémolytique

globules rouges de mouton (lavés 3 fois par centrifugation
en solution physiologique, avant l'emploi)

tampon phosphate de Mayer

Technique
.....Titration du complément (KOILMER DEBAINS)

(tous les chiffres sont indiqués en ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Complément au 1/100	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
Eau physiologique au tampon dilué 5 fois	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	0
antigène	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Laisser au bain-marie à 37° pendant 1 heure

Réactifs :

sérum hémolytique	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
globules rouges de mouton à 2%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

1/200 1/133 1/100 1/80 1/66 1/57 1/50 1/44 1/40

Mettre au bain-marie à 37° C pendant 1 heure. Prendre le premier tube qui hémolyse complètement, c'est-à-dire dans le cas qui nous intéressait, le 4ème tube, donc la dilution au 1/80 è.

Réaction de fixation du complément

On inactive d'abord le sérum pendant une demi-heure au bain-marie à 56° C.

	pur		1/2		1/4		1/8		Témoin
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
sérum	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0
antigène	0,1		0,1		0,1		0,1		0,1
tampon		0,1		0,1		0,1		0,1	0,05
complément	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Mettre au bain-marie à 37° C pendant 1 heure et ensuite ajouter 0,2 ml du complexe hémolytique et remettre au bain-marie pendant 1 heure.

Pour les réactions , il suffit de diluer le complément selon une règle établie d'avance pour chaque antigène (1/100, 1/133, 1/80, etc...)

Résultats

Ils sont tous résumés dans le tableau n° XIX. A la lecture de ce tableau nous voyons d'une part que le complément doit être utilisé au 1/80 ème et d'autre part, qu'aucune réaction positive n'a été obtenue avec les sérums de rats infestés par Angiostrongylus cantonensis. Tous les résultats sont nuls.

Remarque

ANDERSON et coll (1962) ont utilisé CF-52 en employant l'antigène somatique et métabolique d'A. cantonensis et les sérums de Tahitiens souffrant de méningite à éosinophiles et de Tahitiens indemnes.

Parmi 9 sérums examinés, 8 ont donné une réaction positive et le 9ème a réagi faiblement avec l'antigène métabolique. Les auteurs ont également trouvé quelques réactions avec l'antigène somatique.

L'extrait somatique que nous avons préparé qui pouvait être utilisé avec un complément au 1/80ème ne réagit pas avec les sérums de rats infestés et non infestés.

Concentration de protéines dans l'extrait	Dilution de l'extrait	Titre du complément	Réaction avec des sérums de malades																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			pur	1/2			1/4			1/8		Témoin																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
				1	2	3	4	5	6	7	8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
—			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tableau n° XIX
Réaction de fixation du complément

Bibliographie

- ANDERSON (R.I.), SADUN (E.H.), ROSEN (L.), WEINSTEIN (P.P.) et
SAWYER (T.) (1962).— The detection of antibodies in eosinophilic
meningitis. J. Parasit. 48 (2 section 2), 15
- GHEDINI (G.) (1906).— Ricerche sul siero di sangue di individuo affecto
da ciste de echinococco e sul liquido in essa contenuto.
Gazz. osped. Milano 27, 1616

C O N C L U S I O N

Ce travail sur l'Angiostrongylose expérimentale due à Angiostrongylus cantonensis du rat, du chien et du chat nous a permis de mettre en évidence les caractères biologiques et immunologiques de ce Nématode.

L'étude de la biologie du parasite nous a conduit à mettre en évidence le cycle complet de l'Angiostrongle chez le rat en utilisant des mollusques contaminés expérimentalement au laboratoire avec des larves L_1 .

Nous avons utilisé les mêmes mollusques pour infester des chiens, mais si ces animaux ont présenté des signes de méningite les 8ème ou 10ème jours et révélé des larves L_4 dans leur cerveau, nous n'avons jamais retrouvé de vers adultes dans l'artère pulmonaire.

Le seul chat infesté a montré également des symptômes de parésie sans que nous puissions conclure à leur nature parasitaire, puisqu'il ne nous a pas été permis de pratiquer l'autopsie.

Pour effectuer les réactions immunologiques nous avons recueilli les vers adultes dans les artères pulmonaires et le coeur, ainsi que les jeunes immatures dans le cerveau. Nous les avons lavés soigneusement 4 ou 5 fois avec du sérum physiologique et congelés ensuite à -20° C.

Au moment de l'emploi une bonne récolte des adultes est broyée, homogénéisée en tampon phosphate, délipidée par l'alcool absolu et l'éther éthylique. Le tout est ensuite centrifugé, puis le culot séché et extrait en tampon phosphate. Le liquide surnageant de couleur brune représente

l'antigène. Toutes ces manipulations sont faites à basse température.

L'étude biochimique de cet extrait révèle que les protéines, et les glucides semblent être en quantité suffisante pour qu'il soit utilisé pour les tests immuno-sérologiques, qui sont :

- l'agglutination au latex
- l'hémagglutination
- la réaction de précipitation en gélose
- l'immuno-électrophorèse
- l'immuno-fluorescence
- l'intra-dermo-réaction
- la réaction de fixation du complément

Le premier anticorps décelable chez le rat a été découvert le 6ème jour par les réactions d'agglutination au latex, d'immuno-précipitation en boîte de Pétri et en cuve et par l'immuno-électrophorèse en gélose. Une faible réaction a été observée le 4ème jour par l'immuno-fluorescence.

L'intra-dermo-réaction se révélait très significative sur la peau du chien infesté par Angiostrongylus cantonensis et en faisant la réaction croisée, moins significative sur celle du chien infesté par Angiostrongylus vasorum et aucune réaction n'apparaissait sur le tégument du rat.

Le premier des trois tests réagit avec le sérum de malades chroniques (11 mois).

TABLE DES MATIERES

1ère partie

Pages

ETUDE BIOLOGIQUE

Introduction	1
Historique	2
Répartition géographique	4
Hôtes définitifs	7
Hôtes intermédiaires	10
Hôtes paraténiques et hôtes accidentels	15
Etude descriptive	17
Espèces	17
Morphologie	18
Cycle évolutif	19
Recherches personnelles	21
Infestation de l'hôte intermédiaire	21
Infestation de l'hôte définitif	24
Discussion	31
Conclusion	37
Bibliographie	39

2ème partie

ETUDE IMMUNOLOGIQUE

Introduction	44
Préparation d'extraits antigéniques	45
Matériel et méthode	45
Récolte des vers vivants	45
Délipidation	46
Extraction de l'antigène	47

Caractéristiques des antigènes	49
Caractères chimiques	49
Caractères immunologiques	53
Test au latex	54
Hemagglutination	62
Réaction de précipitation	65
Diffusion en cuve	66
Diffusion en plaque	67
Immuno-électrophorèse	68
Réaction allergique	71
Immunofluorescence	76
Réaction de fixation du complément	82
Conclusion	87

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Résultats des analyses électrophorétiques effectuées sur les animaux
infestés expérimentalement par *A. cantonensis* et *A. vasorum*.

Vu et approuvé

Paris, le 22 Décembre 1970

Le Doyen de la Faculté des
Sciences de Paris

L. GAUTHIER

Vu

et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET

